

Rev. Nordest. Biol., 3 (1): 5-55, 1980.

CICLO SEXUAL DE *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) DO LITORAL DO ESTADO DA PARAÍBA

M. Grotta & J. E. Lunetta

ABSTRACT

Histological investigations to establish the different stages of the reproductive cycle have been made. Cytological and cytochemical studies have enabled to follow the morpho-functional changes from mother-cell to oocyte and the identification of the deutoplasm during the vitelogenesis.

INTRODUÇÃO

As constantes e intensivas alterações que vem produzidas em muitos setores do nosso planeta tem acarretado uma série de modificações ecológicas com reflexos, diretos e indiretos, sobre os seres vivos que habitam essas regiões. A estes fatos soma-se, ainda, a dizimação, tanto dos animais como dos vegetais, ocasionada pelo ser humano com a finalidade precípua de obter alimento ou substâncias extrativas com aplicação industrial. À medida que a carência de proteínas para a alimentação se acentua, mais o homem, principalmente das regiões litorâneas, aumenta a predação sobre as populações naturais dizimando a fauna e a flora marinhas sem que estas tenham o necessário tempo para se restabelecerem. Isto acontece, mormente, em virtude do fato de não serem respeitadas as épocas, as estações e os períodos de reprodução dos animais e dos vegetais que permitiriam o restabelecimento cíclico dessas populações. É lógico que essa predação exercida sobre os seres vivos, com o fito de obtenção de alimento, ocorre em regiões que apresentam facilidade de acesso, concentrando-se tal atividade predatória, geralmente, sobre a fauna e a flora da região entre-marés.

Em relação à fauna marinha tal atividade predatória se manifesta, principalmente, sobre os animais sésseis e bentônicos que durante os períodos de baixa-mar se tornam expostos e presas vulneráveis. Entre os animais que, por habitarem regiões com as carac-

terísticas mencionadas, sofrem uma contínua pressão sobre suas populações podemos citar, por exemplo os moluscos, principalmente os bivalves, quer sésseis, que vivem fixos em costões rochosos ou em outros substratos, quer os que vivem, normalmente, enterrados na areia.

Restringindo-nos apenas ao que vem sendo verificado em nosso país, é comum observarmos, hoje em dia, ao longo do litoral de vários Estados do Brasil, costões rochosos, antigamente povoados por maxilhões, completamente despovoados devido à capturas sistemáticas desses bivalves pelo homem, com finalidades alimentares (LUNETTA, com. pes., 1979). Como esse problema vem sendo verificado, também, em relação a outros tipos de animais, em todo o globo terrestre, inúmeras soluções têm sido apontadas visando proteger as populações animais naturais. Entre estas, além da proibição da coleta indiscriminada e predatória, tem-se enfatizado os estudos relativos à aqüicultura e a sua implantação objetivando aumentar a quantidade de proteínas disponíveis para a alimentação humana, minimizando, assim, o efeito da coleta indiscriminada.

Do ponto de vista biológico, a aqüicultura pode ser interpretada como uma atividade do homem para melhorar e incrementar a produção de organismos aquáticos de interesse econômico, por via de manipulações deliberadas de suas taxas de crescimento, mortalidade e reprodução. De acordo com as estatísticas mundiais procedidas pela FAO, foram produzidas através da aqüicultura, em 1975, 6.029.289 T de alimentos correspondendo essa produção, em peso, a 66% de peixes, principalmente de água doce, 16,2% de moluscos, 0,3% de crustáceos e 17,5% de algas marinhas (REAY, 1979). Segundo, ainda, estimativas da FAO, até o ano 2.000, o cultivo de espécies marinhas poderia proporcionar entre 25 a 50 milhões de toneladas de alimento para o consumo humano (ANDREU, 1976).

Evidentemente, a aqüicultura de um determinado tipo de organismo não pode e não deve ser procedida aleatoriamente, sem que se conheça, previamente, a biologia básica do organismo que se pretende cultivar em grande escala. Um dos aspectos biológicos fundamentais a ser considerado é relativo ao conhecimento da reprodução do organismo em questão (GIESE & PEARSE, 1974). Desta forma, é fundamental verificar como se desenvolvem os fenômenos relativos à reprodução: se esta apresenta uma definida correlação estacional ou, se é contínua ao longo do ano ou se ocorre ciclicamente relacionada com os fatores abióticos e bióticos.

Fazendo-se cada vez mais importante a implantação da aqüicultura, tanto de organismos marinhos como de água doce, paralelamente a este fato foi despertada a necessidade de se estudar a atividade reprodutiva desses organismos, em particular de bivalves marinhos, em virtude da relativa facilidade de sua cultura, pois, não há necessidade de se cuidar das larvas, as quais se fixam naturalmente aos diferentes tipos de substrato, nem de sua alimentação.

Segundo GIESE & PEARSE (op. cit.), existem vários métodos de estudos que permitem avaliar a atividade sexual reprodutiva dos animais, quais sejam: 1) pelo cál-

culo do índice gonadal; 2) pela observação da época de eliminação de gametas; 3) pela observação dos esfregaços do tecido gonadal e secções histológicas; 4) pela coleta, de ovos, de embriões, de larvas e de indivíduos juvenis do plâncton. Evidentemente, a escolha do método a ser aplicado vai depender, também, da natureza da pesquisa a ser realizada, podendo-se, entretanto, fazer uma composição das diferentes técnicas mencionadas.

É importante frisar que o estudo do ciclo reprodutivo de bivalves marinhos apresenta importância não só para a aqüicultura como é, também, fundamental para a realização de outras pesquisas nesses animais, pois, sem o conhecimento do ritmo, da frequência e da progressão do ciclo da reprodução, outros estudos, principalmente os de cunho fisiológicos, serão dificilmente abordáveis (LUNETTA, 1969). Corroborando esta assertiva o trabalho realizado por CHAMBERS & MILNE (1979), com invertebrados da zona entre-marés, inclusive bivalves, no qual os autores verificaram que as mudanças dos valores caloríficos e dos pesos de animais de mesmo tamanho estavam relacionados com o estágio do ciclo reprodutivo desses animais. Do trabalho de CARMO & LUNETTA (1978) depreende-se, ainda, a importância desse fato, uma vez que estes autores verificaram que, nos estádios IIIA e IIIC do ciclo sexual de *Perna perna*, o teor lipídico é significativamente mais elevado que no estágio IIIB.

A preocupação da maioria dos autores que, até agora, se propuseram a estudar a reprodução de animais marinhos, tem sido relacionar as variações do ciclo sexual com as mudanças sazonais do meio-ambiente.

Muitos estudos tem sido feitos no sentido de elucidar a maneira pela qual os fatores ambientais agem sobre a reprodução.

Fisiologicamente admite-se que a reprodução seja comandada por fatores intrínsecos, tais como, a interação hormonal entre os centros controladores e o ciclo gametogênico e as reservas nutricionais. A interação dos fatores intrínsecos seria sincronizada pelos fatores extrínsecos, tais como, a temperatura, a salinidade, o fotoperíodo, o alimento, etc. (KINNE, 1970 e GIESE & PEARSE, 1974).

O conhecimento da inter-relação de fatores intrínsecos e extrínsecos propiciou a elaboração de um notável número de pesquisas de grande interesse ecológico embora, na reprodução, os autores não sejam concordes quanto ao grau de importância de cada um deles (GIESE & PEARSE, 1974).

Em nosso estudo do ciclo de *A. brasiliana*, do litoral do Estado da Paraíba consideramos, apenas, dois fatores abióticos, a temperatura e a salinidade, levando-se em consideração a afirmativa de KINNE (1963) de que estes são os dois fatores físicos mais importantes que interferem na vida dos organismos marinhos e de águas salobras, devendo ambos os fatores, em um trabalho, serem considerados conjuntamente.

Em se considerando o biótopo marinho, os seres que vivem na zona de entre-marés, particularmente aqueles que vivem próximos ou na própria região estuarina, são

os mais afetados pelas flutuações ambientais, ou seja, estão mais sujeitos às freqüentes e intensas oscilações da temperatura e da salinidade da água.

KINNE (1970) acrescenta que estando preenchidos certos pré-requisitos, tais como, condições fisiológicas apropriadas e demanda nutritiva, a época da reprodução é, freqüentemente, afetada pela temperatura.

Um aumento da temperatura da água estimula a atividade gametogênica, promovendo a proliferação e o desenvolvimento gonadal (LOOSANOFF & DAVIS, 1952; FRETTER & GRAHAM, 1964 e GABBOTT, 1975); essa maturidade gonadal está na dependência do número consecutivo de dias em que a temperatura da água permanece na amplitude correta para a reprodução (COE, 1932; HALL, 1964 e PFITZENMEYER, 1965).

As variações da salinidade afetam as propriedades funcionais dos indivíduos adultos (KINNE, 1964) o que os levaria, inicialmente, segundo BUTLER (1949), ao fechamento das valvas, e a conseqüente diminuição da taxa de filtração e da tomada de alimentos, portanto, as variações da salinidade agem, indiretamente, sobre a proliferação e o desenvolvimento das gônadas.

LUBET (1959) quando se refere à ação simultânea da temperatura e da salinidade em suas pesquisas relativas à reprodução em *Mytilus edulis*, afirma que ambas tem, verdadeiramente, uma função indireta, muito importante sobre o ciclo gametogênico destes bivalves, pois, estes dois fatores abióticos determinam a composição qualitativa e quantitativa do plâncton, favorecendo a demanda nutritiva destes animais. Assim, afirma o autor, animais bem alimentados e em condições térmicas constantes, apresentam um período gametogênico prolongado.

A quantidade e a qualidade de alimento disponível tem sido apontada como o fator extrínseco capaz de controlar a reprodução.

A proliferação e o desenvolvimento gonadal, ou seja, a primeira etapa da reprodução, pode ocorrer às custas das reservas acumuladas se as condições alimentares não forem favoráveis, mas a segunda etapa da reprodução, ou seja, a diferenciação e o número de gametas eliminados vai depender dos nutrientes do alimento ingerido, pois toda atividade gametogênica implica em gasto energético sendo, portanto, necessário que o animal encontre alimento disponível para o restabelecimento de suas reservas.

O desenvolvimento gonadal e o crescimento dos oócitos envolvem uma intensa atividade metabólica controlada por fatores externos, tais como, a temperatura e o alimento. Portanto, em condições favoráveis de alimentação, a temperatura influe na transferência de reservas armazenadas na glândula digestiva para as gônadas. Essas reservas serão utilizadas pelos gametas em desenvolvimento para a biossíntese de vários componentes. A quantidade de glicogênio e lípidos contidos no alimento digerido ou armazenado na glândula digestiva ou no tecido conjuntivo interfolicular determina, no final, o número de gametas produzidos (LOOSANOFF & DAVIS, 1952; SASTRY & BLAKE, 1971, e WILSON & SEED, 1974).

GABBOTT (1975) sugere um sistema de integração entre a temperatura, o alimento e a gametogênese. Ele afirma que a gametogênese ocorre às custas das reservas de glicogênio e que a temperatura age no processo enzimático envolvido no metabolismo do glicogênio, ocorrendo um sincronismo entre os mecanismos hormonais e o nível de glicose no sangue.

Como foi observado por GIESE (1959), grande parte da literatura sugere que a reprodução de invertebrados marinhos é normalmente limitada a certos períodos do ano, mas estes períodos tendem a ser mais prolongados e menos específicos quanto mais nos aproximamos do Equador, portanto, os fatores ecológicos influenciam mais na duração das fases do que na reprodução.

Os fatores abióticos não alteram a seqüência dos estádios do ciclo sexual mas podem prolongar ou encurtar alguns estádios e aumentar ou diminuir o número de gametas produzidos (COE, 1932).

Animais bem alimentados e em condições térmicas constantes, apresentam um período gametogênico prolongado e mais contínua será a reprodução (GIESE, 1959 e LUBET, 1959). Ocorre, pois, uma relação direta entre a temperatura da água e a duração dos estádios do ciclo sexual.

Com relação especificamente ao estudo da reprodução, somente há alguns anos, iniciou-se no Brasil o estudo do ciclo sexual de bivalves marinhos de interesse comercial. Um dos trabalhos pioneiros foi o de LUNETTA (1969) que determinou as características e a seqüência dos fenômenos reprodutivos de *Mytilus perna*, analisando, inclusive, alguns aspectos referentes à histoquímica de glicogênio, lípidos e RNA, nos diferentes estádios do ciclo reprodutivo deste animal. À seguir, NARCHI (1976), estabeleceu o ciclo anual da gametogênese de *Anomalocardia brasíliana*. Mais recentemente, NASCIMENTO & LUNETTA (1978) descreveram o ciclo sexual da ostra do mangue, *Crassostrea rhizophorae*, ressaltando a importância deste estudo para a ostreicultura na Baía de Todos os Santos e ASSIS (1978), ao proceder o estudo da anatomia funcional de *Lucina pectinata*, determinou, também, o ciclo sexual desta espécie.

Dada a exigüidade de estudos desta natureza em nosso país, os autores brasileiros, ao discutirem os respectivos trabalhos relativos aos ciclos gametogênicos de bivalves marinhos, viam-se na contingência de compararem os seus resultados com aqueles obtidos através de pesquisas efetuadas em bivalves, principalmente do hemisfério norte. Nestas regiões as condições climáticas diferem muito daquelas das regiões em que os autores brasileiros coletaram os animais para os mencionados estudos pois, conforme pode-se constatar pelos trabalhos citados anteriormente, está fartamente documentada a influência da temperatura sobre os fenômenos reprodutivos de lamelibrânquios marinhos.

No presente trabalho nos dispusemos a pesquisar o ciclo sexual do bivalve *Anomalocardia brasíliana*, do litoral do Estado da Paraíba, levando-se em consideração a baixa latitude e as conseqüentes estabilidades climáticas a que está sujeito.

Objetivamo-nos, inicialmente, esclarecer os aspectos relativos:

- 1 – às características e à seqüência dos fenômenos que ocorrem durante o ciclo sexual de *A. brasiliiana*.
- 2 – à diferenciação, particularmente, das células da linhagem reprodutiva feminina, acompanhando suas modificações a partir da fase de célula-mãe.
- 3 – à identificação da natureza química do deutoplasma nos oócitos durante os fenômenos de vitelogenese.

O desenvolvimento dos diferentes tópicos abordados no presente estudo foram, portanto, calcados na histofisiologia, uma vez que esta permite relacionar os aspectos dos tecidos, quer no estado vivo, quer através de preparações histológicas fixadas e coradas, com as diferentes fases do estado funcional de um órgão ou tecido. O objetivo principal da histofisiologia é, pois, propiciar uma base morfológica para o entendimento dos eventos funcionais (DEMPSEY & WISLOCKI, 1946).

MATERIAL

- 1 – O material e sua procedência.

Na realização da presente pesquisa utilizamos uma espécie de moluscos bivalve marinho, de grande interesse comercial, conhecido vulgarmente como marisco branco, pertencente à

Família: Veneridae

Gênero: *Anomalocardia*

Espécie: *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791)

provenientes da Praia do Costinha, Município de Lucena ($6^{\circ}57'45''$ S; $34^{\circ}51'28''$ W), situada no litoral Norte do Estado da Paraíba. O nosso objetivo inicial foi analisar as características e a seqüência do ciclo reprodutivo de *A. brasiliiana*. A fim de termos uma amostragem a qual pudesse ser considerada representativa capturamos, em cada coleta, 200 animais. Obedecemos a um intervalo de 14 dias entre as coletas, as quais foram iniciadas no mês de setembro de 1977 e encerradas em setembro de 1978. A técnica da coleta, realizada sempre durante a baixa-mar, consistiu em se raspar o substrato arenoso, numa profundidade que variou entre 1 a 5 cm, com o auxílio de uma espátula. Desta forma os animais eram removidos da areia, capturados e acondicionados em baldes contendo água do mar. Em seguida os mesmos eram transportados para o laboratório, onde se procedia à seleção de quatro lotes, de 10 animais, com os seguintes comprimentos: 2,0 cm, 2,5 cm; 3,0 cm; e superiores à 3,0 cm.

MÉTODOS

- 1 – Métodos histomorfológicos.

Para procedermos ao estudo histomorfológico das gônadas de *A. brasiliiana*, com

vistas a determinação do ciclo sexual, utilizamos um total de 1.143 animais. Em cada período da coleta (Tab. I) parte da massa visceral de cerca de 40 animais, das classes de tamanhos consideradas, era excisada e fixada na solução fixadora de Navaschin, à temperatura ambiente.

Com a finalidade de evitar que o animal eliminasse gametas durante as manipulações fixamos, inicialmente, o animal todo. Para isto, introduzia-se uma lâmina de bisturi entre as valvas, seccionando-se, desta forma, os músculos adutores, anterior e posterior, fato este que promovia a abertura das valvas, obtendo-se uma ampla exposição das partes moles do animal. Mergulhava-se, a seguir, o animal no líquido fixador por duas ou três horas, tempo suficiente para o enrigecimento da massa visceral, sendo, em seguida, esta seccionada com o auxílio de uma lâmina cortante e novamente mergulhada na solução fixadora por um período que oscilou de 18 a 20 horas.

Após a fixação, submetemos os tecidos às técnicas histológicas rotineiras até a inclusão em parafina, seccionando-se essa porção da massa visceral, contendo as gônadas em micrótomo comum, obtendo-se, em média, secções de 6 μm de espessura. Em seguida os cortes histológicos foram submetidos à coloração pela hematoxilina de Ehrlich e eritrosina.

2 - Citometria

Visando conhecer o tamanho relativo dos diferentes tipos de células da linhagem germinativa e inferirmos sobre a síntese nuclear e citoplasmática, calculamos o volume, em μm^3 , do núcleo e do citoplasma dessas células através da fórmula estabelecida por OLIVO, PORTA & BARBIERIS (1932):

$$V_{(\mu\text{m}^3)} = \frac{\pi}{6} \frac{(D_1 + D_2)^3}{2}$$

na qual D_1 e D_2 representam os valores numéricos de dois diâmetros perpendiculares, de uma mesma célula. Os valores dessas dimensões lineares foram obtidos com o auxílio de uma ocular integradora cariométrica, seguindo critérios por nós estabelecidos:

1) Foram escolhidas gônadas de animais que apresentavam sempre, em maior quantidade, o tipo de célula da qual se pretendia medir os volumes. Assim, por exemplo, para se medir as células-mãe e as espermatogônias utilizamos animais que se encontravam no estágio III C, do ciclo sexual, pois, nesta fase, predominam esses tipos de células.

2) Para medirmos os espermátócitos de 1.^a e de 2.^a ordem e as espermátides, empregamos animais classificados no estágio III B C do ciclo reprodutivo, em virtude de ser possível encontrar, no próprio animal, esses diferentes tipos celulares e estabelecer, comparativamente, as características diferenciais, relativas ao volume.

3) Na mensuração das células foram selecionadas, apenas, aquelas que apresentavam aspectos bem típicos dentro dos padrões pré-estabelecidos.

4) Foram medidas 30 unidades de cada tipo celular estudado.

Estes mesmos critérios foram adotados para as medidas dos volumes das células da linhagem germinativa para os animais fêmeas.

3 - Métodos citoquímicos.

Com o intuito de estudarmos quais as principais substâncias químicas que estavam sendo metabolizadas durante a gametogênese de *A. brasiliensis* fêmeas e inclusive conhecermos a natureza química do vitelo acumulado nos oócitos, procedemos a uma série de reações citoquímicas, conforme indicamos a seguir.

3.1 - Detecção de Carboidratos.

Para a pesquisa dos componentes glicídicos nas células contidas nos folículos gonadais, foram utilizados tecidos fixados na solução de Gendre, incluídos em parafina e seccionados, em micrótomo, com uma espessura média de 6 μm .

3.1.1 - Reação ao ácido periódico de Schiff (PAS) (McMANUS, (1946).

A reação ao P.A.S. está ligada à sistemática histoquímica para a evidênciação de polissacarídeos, mucopolissacarídeos e mucoproteínas.

A reação do P.A.S. se baseia no poder oxidante do ácido periódico sobre todas as substâncias orgânicas contendo carbonos contíguos quando um ou dois desses carbonos têm um radical capaz de originar aldeído. Nessa reação, o ácido periódico cliva a ligação carbono-carbono transformando-os em aldeídos que podem ser detectados pelo reativo de Schiff, originando uma cor vermelho púrpura (HALE, 1957).

3.1.2 - Ação do P.A.S. após o bloqueio pela acetilação, seguido ou não pela desacetilação (McMANUS & CASON, 1950).

A confirmação da reação positiva ao P.A.S., dada pela presença de grupos vic-glicóis, é feita mediante o bloqueio desta reação pela acetilação de todos os carbonos contíguos. O anidrido acético em solução com a piridina promove a esterificação de todos os grupos contendo carbonos contíguos impedindo, assim, a oxidação pelo ácido periódico. Portanto, aplicando-se a reação do P.A.S., após a acetilação, obter-se-á um resultado negativo.

A acetilação é um fenômeno reversível quando se utiliza a técnica da desacetilação, a qual consiste no tratamento dos cortes histológicos por uma solução alcoólica de hidróxido de potássio. Após essa hidrólise somente os grupos vic-glicóis serão restaurados tornando, novamente, a reação positiva ao P.A.S.

3.1.3 - Ação do P.A.S. após o tratamento pelas amilases salivares (LISON, 1960).

Nenhuma reação histoquímica é unicamente específica para a detecção do glicogênio uma vez que glicoproteínas, presentes no tecido, também são positivas à reação do P.A.S. Para assegurarmos um resultado fiel na identificação do glicogênio torna-se

necessário a utilização de técnicas de controle, podendo ser empregado para isto o teste da alfa-amilase a qual age como enzima hidrolítica específica para o glicogênio, nos tecidos animais (LISON, 1960). Em se tratando realmente de glicogênio, o material submetido à ação das amilases mostrará uma diminuição ou perda da positividade à reação ao P.A.S. A reação continuará apresentando resultado positivo, se for uma glicoproteína, pois esta substância é resistente à ação das amilases salivares.

3.1.4 – “Alcian-Blue” (“AB”) em pH 2,5 (PEARSE, 1968).

Este método permite detectar os mucopolissacarídeos de caráter ácido. Tratando-se os cortes histológicos com uma solução de “AB” em pH 2,5, corar-se-ão tanto os mucopolissacarídeos ácidos sulfatados como os carboxilados.

Para a detecção de material positivo ao “AB” foram utilizados tecidos fixados no líquido de Bouin-Hollande, incluídos em parafina e seccionados a 6 μm de espessura.

3.1.5 – “Alcian-Blue” em pH 2,5, apos o bloqueio pela metilação (FISHER & LILLIE, 1954) e saponificação (SPICER & LILLIE, 1959).

A especificidade da reação ao “AB” pode ser aumentada pela metilação dos mucopolissacarídeos de caráter ácido, o que possibilita determinar se o caráter ácido dos mucopolissacarídeos é dado pela presença de grupos carboxilados ou grupos sulfatados (LISON, 1960).

O bloqueio à reação ao “AB” é resultante da esterificação dos grupos carboxilados, podendo ser obtido através da metilação, pelo emprego de uma mistura de álcool metílico com ácido clorídrico, à 60°C. Ainda, em consequência desse tratamento os grupos sulfatados são eliminados ocorrendo, assim, uma dessulfatação; nessas condições, as substâncias que reagirem positivamente ao “AB” não serão, certamente mucopolissacarídeos ácidos.

Submetendo-se os cortes metilados à hidrólise, pelo hidróxido de potássio em solução alcoólica restauram-se, agora, apenas os grupos carboxilados. Assim sendo, a reação positiva ao “AB” em pH 2,5, em cortes metilados e hidrolizados, denota a existência de mucopolissacarídeos ácidos carboxilados.

3.1.6 – “Alcian-Blue” em pH 2,5 seguido ao P.A.S. (VIALLI, 1955).

Os mucopolissacarídeos ácidos se coram em azul e os neutros em púrpura. Ocorrendo a presença destes dois carboidratos, concomitantemente, a tonalidade resultará intermediária.

3.2 – Detecção de proteínas

Para a pesquisa dos componentes protéicos, através da detecção citoquímica de radicais ativos de aminoácidos, foram utilizados tecidos fixados na solução de Navashin, incluindo em parafina e seccionados, em micrótomo com uma espessura média de 10 μm .

3.2.1 – Reação da Aloxana-Schiff para a detecção de grupos amino-livres (YASUMA & ICHIKAVA, 1953).

A Aloxana promove a desaminação oxidativa dos grupos amino-livres das proteínas, formando radicais aldeídos os quais podem ser evidenciados pelo reativo de Schiff.

3.2.2 – Bloqueio da reação Aloxana-Schiff pelo ácido nitroso (BARKA & ANDERSON, 1963).

Esta reação de bloqueio consiste em uma desaminação prévia obtida pelo tratamento dos tecidos com o ácido nitroso, a frio, o qual promove um bloqueio dos grupos amino impedindo, assim, a ação da Aloxana.

3.2.3 – Reação do ferricianeto férrico para a detecção de radical sulfidril (aminoácido cisteína) (CHÉVREMON & FREDERIC, 1943).

Este método se baseia no poder redutor do radical sulfidril. O princípio da reação está baseado na redução dos íons ferricianeto à ferrocianeto pelos radicais sulfidril presentes nos tecidos. O ferrocianeto combina-se com os íons férricos dando um precipitado azul insolúvel, o azul da Prússia, (PEARSE, 1968). Este método não é específico para os grupos sulfidril, uma vez que pode ser utilizado também para outras substâncias de poder redutor.

O controle desta reação é feito através do bloqueio dos radicais sulfidrilas, pela iodoacetamida, em meio alcalino que reage de forma irreversível (BARKA & ANDERSON, 1963).

Portanto, as substâncias que reagem positivamente ao método de Chévremont & Frédéric e negativamente após o mencionado bloqueio, podem ser considerados como grupamentos sulfidrilas.

3.2.4 – Detecção de radicais dissulfeto – Aminoácido cistina (BARKA & ANDERSON, 1963).

Nesta reação, os radicais sulfidril existentes nos tecidos são, previamente, bloqueados pela reação com iodoacetamida, em meio alcalino. A seguir os cortes histológicos são tratados por uma solução de tioglicolato de sódio a qual atua sobre os radicais dissulfeto reduzindo-os à sulfidril sendo estes detectados de acordo com a técnica descrita no item precedente.

3.2.5 – Detecção do aminoácido triptofano (LISON & PINHEIRO, 1960).

Os cortes histológicos de tecidos tratados com o paradimetilaminobenzoaldeído (PABA), em presença de um oxidante, como o nitrito de sódio, se contiverem triptofano este se condensará originando um pigmento azul brilhante.

3.2.6 – Reação de bloqueio para o triptofano (TÖENNIES, 1942).

O controle da ocorrência do aminoácido triptofano em cortes histológicos pode ser realizado com o emprego do ácido perfórmico o qual oxida o triptofano, bloqueando a reação com o PABA.

3.3 – Detecção de lípidos

Para a investigação da presença de componentes lipídicos nas gônadas, a massa visceral de *A. brasiliensis* fêmeas foi fixada em formol salino-cálcio de Baker, durante 20 horas e seccionada, com cerca de 12 μ m de espessura, em micrótomo de congelamento.

3.3.1 – Sudan III (LISON, 1960)

O sudan III cora em vermelho-alaranjado os lípidos neutros.

O emprego de corantes solúveis nos lípidos, para a sua evidenciação, representa um processo físico-químico, diferindo daqueles procedimentos gerais de coloração que envolvem mecanismos químicos. Em ambos os casos, do Sudan Black B e do Sudan III, a coloração conferida, aos lípidos, pelos lisocromos, é fundamentada no fenômeno de adsorção.

3.3.2 – Sudan Black B (LISON, 1960)

O Sudan Black B é um corante do grupo dos lisocromos, sendo o mais eficaz para evidenciar lípidos em geral, corando-os em negro ou azul escuro.

3.3.3 – Sulfato Azul do Nilo (LISON, 1960)

Essa reação é utilizada para evidenciar lípidos de caráter ácido e neutro. Uma solução de Sulfato Azul do Nilo cora os lípidos neutros em róseo e os ácidos em azul.

3.3.4 – Hemateína ácida de Baker (BAKER, 1946)

Esse método foi utilizado para a evidenciação de fosfolípidos.

Fundamenta-se esta técnica na insolubilidade dos lípidos na água, com posterior ligação com o cromo. Esse, ligado aos lípidos, pode então ser revelado pela hemateína, através de áreas de cor negra intensa. Conforme preconiza a técnica, este método deve ser controlado pela extração dos lípidos pela piridina o que, evidentemente, abolirá a cor negra originada pela presença de fosfolípidos nos cortes histológicos.

3.4 – Detecção de ácidos nucleicos (RNA)

3.4.1 – Reação da galocianina em pH 1.6 (EINARSON, 1951).

Em meio aquoso, a galocianina é levemente ácida e em temperaturas elevadas forma três complexos com a alúmen de cromo um dos quais é responsável pela coloração dos ácidos nucleicos formando um complexo azul escuro.

A fim de confirmar a presença de RNA, composto macromolecular não dialisável, procedeu-se à digestão do mesmo pela ribonuclease a qual hidrolisa o RNA em fragmentos solúveis e dialisáveis. Após este tratamento, a coloração devida ao RNA é abolida dos cortes histológicos, quando submetidos aos métodos histológicos usuais de detecção.

RESULTADOS

1 – Descrição das gônadas

Em nossos estudos, não foi possível distinguir, macroscopicamente, os animais machos das fêmeas através da coloração das gônadas, uma vez que estas apresentam-se esbranquiçadas em ambos os sexos. Quanto à anatomia das gônadas de *A. brasiliiana*, observamos que as mesmas são pares preenchendo, quando maduras, o espaço disponível, por entre as alças intestinais, na massa visceral. Esta espécie de bivalve é uni-sexuada e, em ambos os sexos, as gônadas formam uma intrincada rede túbulo-acinosa composta, que se reúne num ducto comum que se abre para o exterior através de uma pequena papila situada próxima à porção anterior do rim. Durante a análise dos cortes histológicos das gônadas não constatamos a existência de animais hermafroditas prevalecendo, portanto, pelo que foi exposto, as observações de NARCHI (1974 e 1976).

2 – Aspectos histomorfológicos dos folículos

2.1 – Gametogênese

Durante a gametogênese ocorre um processo contínuo de divisão e especialização celular a partir da célula denominada célula-mãe, a qual vai adquirindo características próprias até a formação de gametas. Este processo dinâmico de especialização celular foi, convencionalmente, dividido em etapas nas quais as células recebem denominações particulares.

Constata-se pelos cortes histológicos realizados que os elementos celulares da linhagem germinativa, tanto nos animais machos como nas fêmeas, apresentam uma disposição mais ou menos regular no interior dos folículos. As células-mãe se encontram presas à parede folicular e o desenvolvimento ocorre da periferia para o centro do folículo de modo que os gametas maduros situam-se livres no interior do mesmo.

2.2 – Oôgenese

Os dados referentes aos volumes citoplasmáticos e nucleares, mencionados a seguir, podem ser constatados através da Tabela II.

Pela análise dos cortes histológicos das gônadas de *A. brasiliiana* fêmea nós verificamos que as células-mãe (Cm, Fig. 1 e 6) são cúbicas com citoplasma levemente acidó-

filo, contendo pequenos grânulos basófilos. O núcleo é esférico possuindo uma cromatina condensada, fortemente basófila, e um único nucléolo.

As células-mãe se dividem por mitose originando as oogônias (O, Fig. 1, 6 e 7) as quais aumentam de tamanho no plano paralelo à parede do folículo, aumentando a quantidade de grânulos basófilos no interior do citoplasma. A oogônia não mais se divide por mitose terminando a fase proliferativa. Inicia-se, então a divisão meiótica, mas ocorre um bloqueio em prófase I da meiose, o núcleo passa a ser referido como vesícula germinal. Instala-se a fase vegetativa ou de crescimento, na qual ocorrem os fenômenos da pré-vitelogênese e da vitelogênese.

Em decorrência destas alterações morfo-funcionais, as células germinativas recebem denominações específicas em cada fase.

a – Oócito basófilo (Ob, Fig. 1, 6 e 7)

O citoplasma desta célula apresenta uma granulação basófila perinuclear muito intensa. A vesícula germinal contém dois nucléolos, um grande – o eunucléolo, e um outro menor – o paranucléolo.

A partir desta fase o crescimento celular se intensifica, principalmente no plano perpendicular à parede do folículo. Conseqüentemente, os oócitos à medida que aumentam de volume, reduzem a zona de contato com parede folicular. Os oócitos tornam-se piriformes, mantendo-se presos à parede do folículo por intermédio de um pedúnculo enquanto que a extremidade arredondada volta-se para a luz do folículo.

b – Oócito em pré-vitelogênese (pV, Fig. 1 e 7)

O citoplasma desta célula apresenta escamas basófilas com distribuição perinuclear. A vesícula germinal possui um só nucléolo, o anfinucléolo, localizado excêntricamente.

c – Oócito em vitelogênese (V, Fig. 1, 6 e 7)

O citoplasma dessa célula apresenta grânulos acidófilos, de diferentes tamanhos. A vesícula germinal apresenta as mesmas características descritas na fase anterior.

d – Oócito maduro (M, Fig. 3, A e 7)

O pedúnculo se rompe e as células se tornam esféricas e ficam livres no interior dos folículos. O citoplasma se apresenta repleto de grânulos acidófilos, de diferentes tamanhos, distribuídos homogêaneamente. A vesícula germinal possui cromatina frouxa e reticular. O anfinucléolo está muito desenvolvido e se localiza próximo à membrana nuclear.

2.3 – Espermatogênese

As observações pertinentes ao volume nuclear das células da linhagem germinativa, mencionados a seguir, podem ser observados na Tabela III e figuras 2 e 4.

As células-mãe (Cm) estão presas à parede folicular, possuem um citoplasma fracamente acidófilo; o núcleo contém um único nucléolo

As espermatogônias (E) possuem um citoplasma muito reduzido; o núcleo contém dois nucléolos.

Os espermátócitos de 1ª ordem (E_1) possuem menor quantidade de citoplasma e o núcleo apresenta uma cromatina condensada e os cromossomos se encontram em sub-fases da prófase I da divisão meiótica.

O citoplasma dos espermátócitos de 2ª ordem (E_2) e das espermátides (S) se reduziu ainda mais e o núcleo vai se condensando até a formação de espermatozóide (S_p) com a cabeça em forma de vírgula e uma cauda muito longa, voltada para o centro do folículo.

2.4 – Caracterização das fases do ciclo sexual

CHIPPERFIELD (1953) ao estudar os aspectos das gônadas, durante as fases de gametogênese de *Mytilus edulis*, propôs uma classificação que foi posteriormente adotada por LUBET (1959) para *M. edulis* e *M. galloprovincialis*; por LUNETTA (1969) para *M. perna*; por NARCHI (1976) para *Anomalocardia brasiliana* e por ASSIS (1978) para *Lucina pectinata* e que será, em parte, por nós adotada.

Basicamente, são estes os estádios:

ESTÁDIO I – Início do desenvolvimento dos folículos, estão presentes células-mãe e gônias.

ESTÁDIO II – Os fenômenos gametogênicos se intensificam e as diferentes fases das células germinativas, com exceção de gametas maduros, já estão presentes.

ESTÁDIO III – Corresponde à maturidade sexual. Nos folículos estão presentes todas as células da linhagem germinativa.

Este estágio III pode ser subdividido de acordo com as diferentes fases de diferenciação, maturação e/ou a eliminação de gametas, em:

ESTÁDIO IIIA – folículos totalmente repletos. Estão presentes, em proporções semelhantes, todas as células da linhagem germinativa.

ESTÁDIO IIIB – folículos vazios, eliminação total de gametas maduros.

ESTÁDIO IIIC – recuperação dos folículos às custas das sucessivas divisões mitóticas das células germinativas remanescentes na parede folicular com posterior diferenciação e maturação dos gametas.

ESTÁDIO IIID – final da gametogênese; folículos vazios e reduzidos.

Na presente descrição do ciclo sexual de *A. brasiliiana*, dada as discrepâncias verificadas em relação aos trabalhos desenvolvidos anteriormente, tornou-se impossível adotar, exatamente, a mesma denominação usada pelos autores acima mencionados, para definir os diferentes estádios do ciclo sexual.

Para a determinação das características e a seqüência dos diferentes estádios do ciclo sexual de *A. brasiliiana*, fundamentamos nossa pesquisa em animais que se encontravam sexualmente maduros, portanto no estádio III, o qual em nossa pesquisa foi subdividido em estádios IIIAB, IIIBC, IIIB e IIIC.

2.4.1 – Estádio IIIAB (Maturação e eliminação)

É importante salientar que enquanto progridem as diferentes fases da gametogênese, ocorre, simultaneamente, a eliminação de grande quantidade de gametas: oócitos, nas fêmeas e espermatozoides, nos machos.

FÊMEAS (Fig. 1 e 3,A)

Neste estádio, os folículos apresentam grande diâmetro, suas paredes são bastante finas e justapostas. O tecido conjuntivo interfolicular é muito reduzido. Ocorre um predomínio acentuado de oócitos em vitelogênese (V). Encontramos oócitos maduros (M) livres no interior dos folículos. Podemos observar, além destas células, todas as diferentes fases das células da linhagem germinativa na parede folicular: células-mãe (Cm); oogônias (O) e oócitos basófilos (Ob).

MACHOS (Fig. 4,A e B)

Aspectos semelhantes aos verificados com as fêmeas podem ser verificados em animais machos, neste estádio. Ocorre um predomínio acentuado de espermatozoides (Sp.). Embora possam ser observadas todas as células das diferentes fases da espermatogênese.

2.4.2 – Estádio IIIBC (Eliminação parcial e recuperação)

Verifica-se, neste estádio, uma redução do diâmetro dos folículos, em consequência da eliminação de gametas, desaparecendo a contigüidade das paredes foliculares (pf). O tecido conjuntivo interfolicular prolifera preenchendo os espaços por entre as paredes foliculares.

FÊMEAS (Fig. 3,B)

Ocorre um predomínio de oócitos em pré-vitelogênese (pV) sobre os oócitos em vitelogênese (V) e maduros (M). Aumenta, neste estádio, o número de oogônias (O) e dos oócitos basófilos (Ob).

MACHOS (Fig. 4, C e D)

Ocorre um predomínio de espermátocitos de 2.^a ordem (E_2) e de espermátides (S) sobre as demais células da linhagem germinativa.

2.4.3 – Estádio IIIB (Eliminação total)

A eliminação total de gametas só ocorre nas fêmeas (Fig. 3,C)

Neste estágio os folículos estão vazios, a parede folicular está bastante delgada possuindo muitas células pavimentosas entre as quais se localizam as células-mãe (Cm). Restam ainda, em alguns folículos oócitos em vitelogênese (V).

2.4.4 – Estádio IIIC (Recuperação)

FÊMEAS (Fig. 3, D)

Nesta fase, em decorrência das divisões mitóticas sucessivas das células-mãe (Cm) e das oogônias (O), a parede folicular atinge o máximo do seu desenvolvimento, apresentando-se bastante espessa. Os folículos apresentam um aspecto bastante irregular e o tecido conjuntivo interfolicular se desenvolve por entre as suas paredes.

MACHOS (Fig. 4, E e F)

A espermatogênese é um processo muito mais rápido e mais intenso do que a oogênese por isso os folículos, nos machos, já possuem, novamente, todas as células da linhagem germinativa em iguais proporções.

2.5 – “Sex-ratio”

Foram examinados 1.143 animais, sendo 592 machos e 551 fêmeas ocorrendo, portanto, um certo equilíbrio entre o número de indivíduos machos e fêmeas, na população. (Tabela I e Fig. A e B)

2.6 – Frequência dos diferentes estádios do ciclo sexual (Tab. IV e V e Figs. C, D, E e F)

SETEMBRO

Na primeira quinzena, 100,0% dos animais machos e fêmeas encontravam-se no estágio IIIAB; na segunda quinzena, 100,0% dos machos e 88,9% das fêmeas estavam no estágio IIIAB enquanto 11,1%, das fêmeas, estavam no estágio IIIBC.

OUTUBRO

100,0% dos animais machos estavam no estágio IIIAB nas coletas realizadas neste mês, quanto as fêmeas, 90% estavam no estágio IIIAB e 10,0% estavam no estágio IIIBC.

NOVEMBRO

Todos os animais coletados, tanto machos como fêmeas, estavam no estádio IIIAB, neste mês.

DEZEMBRO

Todos os animais machos coletados neste mês estavam no estádio IIIAB, quanto às fêmeas, 91,3% estavam no estádio IIIAB e 8,7% estavam no estádio IIIBC.

JANEIRO

100,0% dos animais machos e 42,1% das fêmeas, na primeira e 33,0% dos machos e 0,0% das fêmeas, na segunda coleta, estavam no estádio IIIAB. Quanto ao estádio IIIBC, 42,1% e 64,7% das fêmeas, na primeira e segunda coletas, respectivamente e 66,7% dos machos, na segunda coleta também estavam neste estádio. Ainda em relação às fêmeas, 10,5% e 29,5% estavam no estádio IIIC, enquanto que 5,3% e 5,9% estavam no estádio IIIB, na primeira e segunda coletas, respectivamente.

FEVEREIRO

Entre os machos, na primeira coleta, 40,0% estavam no estádio IIIAB e 60,0% estavam no estádio IIIBC, alterando-se estes valores para 9,5% e 90,5% na segunda coleta. Entre as fêmeas, 82,6% e 89,5% estavam no estádio IIIBC, enquanto que 17,4% e 10,5% estavam no estádio IIIBC, na primeira e segunda coletas, respectivamente.

MARÇO

Nos machos, 27,3%, na primeira e 66,7%, na segunda coleta, estavam no estádio IIIAB. 83,3% e 30,4%, das fêmeas e 68,2% e 27,8%, dos machos, estavam no estádio IIIBC, na primeira e segunda coletas, respectivamente. 16,7% e 69,6%, das fêmeas, estavam no estádio IIIC, e apenas 4,5% e 5,5%, dos machos, estavam neste estádio, na primeira e segunda coletas, respectivamente.

ABRIL

Dos animais machos coletados, 18,2%, e 9,1%, estavam no estádio IIIAB; 77,3%, 80,0% e 81,8%, estavam no estádio IIIBC e apenas 4,5%, 10,0% e 9,1%, estavam no estádio IIIC, nas três coletas realizadas durante este mês. Na primeira e segunda coletas, 100,0% das fêmeas estavam no estádio IIIC e na terceira coleta enquanto que 88,3% estavam no estádio IIIC, 11,7% estavam no estádio IIIB.

MAIO

Apenas 3,7% e 14,3% dos animais machos estavam no estádio IIIAB na primeira e segunda coletas do mês; 13,0% e 40,0%, das fêmeas; 57,3% e 67,8%, dos machos, estavam no estádio IIIBC, na primeira e segunda coletas do mês, respectivamente. 66,6%

e 33,3%, das fêmeas e 37,0% e 17,9%, dos machos, na primeira e segunda coletas estavam no estágio IIIC. Apenas 17,4% e 26,7%, das fêmeas, na primeira e segunda e segunda coletas, estavam no estágio IIIB.

JUNHO

79,0% e 100,0%, dos machos, estavam no estágio IIIBC e 21,0% e 0,0% estavam no estágio IIIAB, na primeira e segunda coletas respectivamente. Quanto às fêmeas, 32,0% e 50,0%, estavam no estágio IIIBC 16,0% e 31,8%, estavam no estágio IIIC, na primeira e segunda coletas, respectivamente.

JULHO

Neste período houve um aumento considerável da quantidade de animais no estágio IIIAB; de 20,0% para 57,1%, nos machos e de 20,0% para 94,7%, nas fêmeas. Verificou-se, ainda, uma redução da percentagem de animais no estágio IIIBC; de 80,0% para 42,9% e de 70,0% para 5,3%, nos machos e fêmeas, na primeira e segunda coletas, respectivamente. Apenas 10,0%, das fêmeas, na primeira coleta estavam no estágio IIIC.

AGOSTO

100,0% das fêmeas, em ambas as coletas, estavam no estágio IIIAB; 86,3% e 87,5% dos machos, estavam no estágio IIIAB, enquanto que 13,7% e 12,5% estavam no estágio IIIBC, na primeira e segunda coletas, respectivamente.

SETEMBRO

Em setembro de 1978, na primeira coleta, 100,0% dos animais machos e fêmeas estavam no estágio IIIAB. Na segunda coleta, 94,4% das fêmeas estavam no estágio IIIAB enquanto que 5,6% estavam no estágio IIIBC.

4.5 – Temperatura e Salinidade

Como se pode verificar pela Tabela VI, a temperatura da água do mar registrada, no local de coleta, variou de 25°C, nos meses de junho, julho e agosto, que correspondem aos meses de inverno, à 30°C, nos meses de verão, dezembro, janeiro, fevereiro e março.

A salinidade variou de 29‰, nos meses de junho, à 34‰ nos meses de dezembro e janeiro.

Portanto, esta região se caracteriza por apresentar fatores abióticos relativamente estáveis, tal como a temperatura e a salinidade, ao longo do ano. (Figs. G e F).

Baseados nos resultados expressos nas Tabelas IV e V e, ainda, nas figuras C, D, E, F, G e H concluímos que, de uma forma geral, há um paralelismo na seqüência das fases do ciclo sexual de animais machos e fêmeas verificando-se, apenas, divergências de percentagens nos diferentes estádios. É curioso notar, comparando os gráficos das figuras C, D e F, correspondentes a estádios sexuais que ocorrem em ambos os sexos que, no

período referente aos meses de setembro outubro, novembro e dezembro, cerca de 90% das fêmeas e 100% dos machos, encontravam-se no estágio IIIAB, sendo muitíssimo reduzido, nesses quatro meses, as percentagens de animais fêmeas no estágio IIIBC. Somente a partir de janeiro, quando decresce abruptamente a percentagem de animais de ambos os sexos no estágio IIIAB é que principia a aumentar a percentagem de animais machos e fêmeas, no estágio IIIBC. Ainda, pela comparação dos gráficos contidos na figura D com aquele da figura E, constatamos que, no mês de abril, a percentagem de fêmeas no estágio IIIBC atinge 0%, sendo este valor de 100% para o estágio IIIC, neste mesmo período. A fase de recuperação, estágio IIIC (Fig. F) é um fenômeno muito mais evidente nas fêmeas do que nos machos. Enquanto nas primeiras este estágio atingiu um valor de 100%, em abril, nos machos estes valores não excederam 10%. É bastante conveniente ressaltar que o estágio de esvaziamento total dos folículos, estágio IIIB, ocorreu apenas nas fêmeas (Fig. E), em percentagem muito reduzida no mês de janeiro, tendo-se verificado um aumento na percentagem de animais neste estágio nos meses de abril, maio e junho, porém não ultrapassando o valor de 31,8%.

4.6 – Diferenciação das células da parede folicular

A parede dos folículos gonádicos de *A. brasiliense* é constituída, em ambos os sexos, por células pavimentosas.

Nas fêmeas, as células que se diferenciarão em células germinativas se distinguem das demais por apresentarem um núcleo esférico, sendo denominada de célula-mãe e estão, ainda, inseridas na parede folicular, circundadas por células pavimentosas.

As células-mãe se dividem por mitose originando novos elementos celulares denominados de oogônias, as quais se desenvolvem progredindo para o interior do folículo. As células foliculares pavimentosas, que circundavam as células-mãe, também se dividem por mitose, originando células foliculares de aspecto cúbico, as quais revestem a porção da oogônia voltada para o centro do folículo (setas, Fig. 5).

Em função do material basófilo, citoquimicamente detectado no citoplasma da célula germinativa, esta passa a ser chamada de oócito basófilo. As células foliculares que o recobrem passam a apresentar um aspecto cilíndrico.

A célula germinativa, em virtude das novas características morfológicas e citoquímicas apresentadas, passa a ser denominada de oócitos em pré-vitelogênese. A partir dessa fase o oócito já se encontra equipado para a síntese do vitelo e da camada coriônica. Simultaneamente à formação da camada coriônica ocorre o desprendimento das células foliculares que revestem o oócito.

No final da vitelogênese as células foliculares se despreendem totalmente e começam a degenerar podendo ser vistos, apenas, restos de material citoplasmático por sobre o córion de oócitos maduros.

4.7 – Citoquímica

A identificação de carboidratos, nas células dos folículos gonádicos de *A. brasiliana* fêmea, foi procedida pela reação destas substâncias ao ácido periódico Schiff (P.A.S.).

Esta reação evidenciou dois tipos de granulações, uma fina (gf) e outra grossa (gg) ambas P.A.S. positivas (Fig. 8).

A granulação grossa pertence às células foliculares que envolvem as células-mãe, as oogônias (O) e os oócitos basófilos (Ob).

O citoplasma dos oócitos em vitelogênese I (V_1) e II (V_2) apresentou somente o tipo de granulação fina. Verificou-se que, à medida que ocorre o aparecimento da granulação fina nos oócitos em vitelogênese, há uma redução da granulação grossa das células competentes da parede folicular (pf).

Na região correspondente ao córion, também foi evidenciada a presença de substâncias positivas ao P.A.S. (Fig. 8).

A granulação grossa, detectada nas células foliculares, após a ação da alfa-amilase, resultou P.A.S. negativa demonstrando, desta forma, a sensibilidade desta granulação à ação hidrolítica da enzima, o que caracteriza a presença do glicogênio. Quanto à granulação fina, esta não foi afetada pela ação da alfa-amilase, mantendo-se a positividade ao P.A.S., o mesmo se verificando em relação à camada coriônica. Constatou-se, também, que as células-mãe, oogônias e oócitos basófilos, não apresentam granulações quer grossas ou finas, P.A.S. positivas. (Fig. 9).

Nos cortes histológicos submetidos à acetilação, a resposta ao P.A.S. foi abolida, recuperando-se a positividade a esta reação após a desacetilação confirmando, assim, a presença de grupamentos vic-glicóis, provavelmente a ocorrência de um carboidrato. Portanto, a granulação fina, correspondente à porção glicídica do vitelo, está presente nos oócitos em vitelogênese I e II e principalmente nos oócitos maduros.

A identificação de substâncias mucopolissacarídicas, de caráter ácido, nas células dos folículos gonádicos, foi feita através da ação do "Alcian-Blue", em pH 2,5.

O citoplasma dos oócitos, em pré-vitelogênese e em vitelogênese I e II, apresentou-se levemente corado em azul, com uma coloração mais acentuada correspondente a uma granulação (g) na região próxima à parede folicular. À medida que a oogênese progride, ou seja nos oócitos basófilos, em pré-vitelogênese, em vitelogênese I e II e oócitos maduros, foi evidenciado no córion (C) substâncias "AB" positivas (Fig. 9).

Após o bloqueio, pela metilação, o resultado da reação ao "AB" foi negativo.

O material submetido à metilação e posteriormente à saponificação apresentou um resultado positivo à reação do "AB" confirmando, assim, a presença de substâncias de natureza mucopolissacarídica ácida carboxilada.

Os cortes histológicos submetidos à associação dos métodos "AB" e P.A.S. apresentaram os seguintes resultados; as células foliculares responderam positivamente à reação do P.A.S. indicando a presença, unicamente, de mucopolissacarídeo de caráter neutro; os oócitos em pré-vitelogênese e em vitelogênese I e II e maduros apresentaram resposta positiva tanto ao "AB", em pH 2,5, quanto ao PAS, resultando uma coloração

mesclada, azul-púrpura, o que denota a presença de substâncias mucopolissacarídicas de caráter ácido e neutro. O córion apresentou uma coloração de tonalidade azulada refletindo a predominância de substância mucopolissacarídica de caráter ácido.

Pela reação do ferrocianeto férrico foi possível observar no citoplasma dos oócitos em vitelogênese I e II e maduros uma granulação fina, homoganeamente dispersa pelo citoplasma, aumentando a intensidade da reação à medida que progride a vitelogênese. Na constituição química do componente protéico do vitelo, ocorrem, portanto, os aminoácidos cisteína e cistina. Tanto o córion quanto o anfinucléolo apresentaram uma resposta positiva ao método aplicado denotando a existência de radicais sulfidril e disulfeto (Fig. 10 e 11).

A pesquisa do aminoácido triptofano nas células da linhagem germinativa oogênica, foi feita através do paradimetilaminobenzoaldeído.

Este aminoácido foi evidenciado no citoplasma dos oócitos basófilos, em pré-vitelogênese e em vitelogênese, sob a forma de grânulos concentrados, principalmente, próximos à parede folicular.

A reação do Aloxana-Schiff permitiu identificar uma granulação homoganeamente dispersa pelo citoplasma dos oócitos em pré-vitelogênese, em vitelogênese e maduros, indicando a presença de grupamentos amino-livres no deutoplasma dessas células. O anfinucléolo, também, mostrou-se positivo ao método empregado.

Na identificação das substâncias lipídicas, empregamos métodos para uma verificação geral dessas substâncias, através do Sudan Black, bem como para o discernimento de lípidos ácidos e neutros através da Hemateína ácida de Baker e Sudan III, respectivamente.

Constatou-se pelo primeiro método, a ocorrência de lípidos no deutoplasma dos oócitos em vitelogênese e maduros.

Foi possível verificar através do método do Sudan III a presença de lípidos neutros e através da Hemateína ácida de Baker, a ocorrência de lípidos ácidos.

O emprego do Sulfato de Azul do Nilo permitiu confirmar a existência de lípidos neutros no deutoplasma de oócitos em vitelogênese e maduros, provavelmente um triglicérido, e de lípidos de caráter ácido, provavelmente um fosfolípido. Deve-se ressaltar, contudo, que pelas intensidades das colorações desenvolvidas com o emprego desta última técnica parece haver um predomínio da quantidade de lípidos ácidos em relação aos neutros.

A identificação de ácidos nucléicos, especificamente, ácido ribonucleico ooplasmático, nas diversas células da linhagem gametogênica feminina de *A. brasiliensis* foi feita pela reação à galocianina, em pH 1,6. Esta reação foi positiva na oogônia (O) e mais intensa no oócito basófilo (Ob). Na fase de oócito em pré-vitelogênese (pV) o RNA ooplasmático apresentou-se concentrado na forma de escamas com disposição perinuclear. Nos oócitos em vitelogênese I (V₁) e maduros (M), embora a reação tenha se manifestado positiva, isso ocorreu somente, em algumas estruturas dispersas no citoplasma. A

porção densa do anfinuléolo (seta) também apresentou uma reação positiva à galocianina (Fig. 7).

DISCUSSÃO

Pelo que foi exposto na introdução depreende-se, facilmente, que inúmeros são os autores que atribuem aos fatores abióticos e bióticos uma influência direta, ou mesmo imediata, sobre as características e a seqüência dos fenômenos reprodutivos de invertebrados marinhos. Constata-se, também, que os autores não são concordes quanto ao modo de ação desses fatores. Para alguns pesquisadores apenas um fator parece ser responsável pela reprodução dos organismos, enquanto que para outros, os fenômenos reprodutivos estão na dependência de no mínimo duas ou mais variáveis do meio ambiente.

Segundo trabalhos realizados por COE (1932), LOOSANOFF & DAVIS (1952), LUBET (1959), ANSELL (1961), HALL (1964), PFITZENMEYER (1965), NEWMAN (1967), WILSON & SEED (1974), GABBOTT (1975), e DE VILLIERS (1975), ficou bem determinado que a temperatura da água exerce uma importante influência sobre os fenômenos e as épocas de reprodução de invertebrados marinhos. BUTLER (1949), KINNE (1964), WILSON (1969), GIESE & PEARSE (1974) e BAYNE *et al* (1978) enfatizam a influência de outros fatores abióticos sobre os períodos e os fenômenos reprodutivos dos organismos marinhos.

Mencionamos também que, infelizmente, no Brasil tem sido muito escassos os trabalhos que visam estudar o ciclo reprodutivo de animais marinhos, principalmente, daqueles de interesse comercial, o que tem obrigado, de certa forma, os autores brasileiros discutirem os seus resultados com aqueles obtidos, por outros autores, para outras regiões, principalmente do hemisfério norte.

Quando desenvolvemos a presente pesquisa consideramos a grande extensão do litoral brasileiro que, em função das diferentes latitudes, propicia uma acentuada diversidade dos fatores fisioecológicos, o que poderia afetar as épocas da reprodução dos organismos e, em particular, de moluscos bivalves.

Contrariamente ao estipulado por LUNETTA (1969) para *Mytilus perna* e LUBET (1959) para *Mytilus edulis* e *M. galloprovincialis*, não foi possível, em nenhuma etapa do ciclo sexual de *A. brasiliiana* distinguir-se, macroscopicamente os animais machos das fêmeas através da coloração das gônadas, pois, estas apresentam sempre uma coloração esbranquiçada em ambos os sexos, fato este também verificado por ASSIS (1978) para *Lucina pectinata*.

O "sex-ratio" da população estudada de *A. brasiliiana* do litoral do Estado da Paraíba, demonstrou que a população apresenta os sexos separados, sendo o número de machos e fêmeas aproximadamente igual tal como foi, também, constatado por LUNETTA (1969) e LUBET (1959) para *M. perna*, *M. edulis* e *M. galloprovincialis*, respectivamente.

Na caracterização do ciclo sexual do bivalve *A. brasiliana* levamos em consideração apenas os animais maduros, mais precisamente, no estágio III. Utilizamos animais de tamanhos variados, mas sempre com mais de 2,0 cm de comprimento. Embora não tenhamos procedido, especificamente um estudo relativo aos estádios iniciais do desenvolvimento das gônadas desses animais, nossas observações permitiram verificar que a partir de 0,8 cm de comprimento os animais já se encontravam sexualmente maduros.

Evidentemente, o ciclo sexual se desenvolve de uma maneira contínua e ininterrupta, e, para podermos descrevê-lo atribuímos à fases mais típicas uma denominação particular. Assim, o estágio III, de acordo com as características microscópicas, foi por nós dividido, para os animais machos nos subestádios IIIAB, IIIBC e IIIC. As fêmeas foram divididas nos subestádios IIIAB, IIIBC, IIIB e IIIC. Ao confrontarmos os nossos resultados com aqueles obtidos por LUBET (1959), LUNETTA (1969), NARCHI (1976) e ASSIS (1978), verificamos não haver correspondência absoluta entre subestádios estabelecidos por aqueles autores, os quais dividem o estágio III, também em bases às características histológicas, nos subestádios IIIA, IIIB, IIIC e IIID, subdividindo, ainda, o estágio IIIA, em IIIA₁ e IIIA₂, para ambos os sexos.

O primeiro subestádio, do estágio III, foi por nós caracterizado como IIIAB, em virtude do fato dos animais que se encontram nesta fase, além de apresentarem em seus folículos fenômenos típicos de gametogênese, já se encontrarem sexualmente ativos no sentido de eliminarem gametas.

Não foi observado aquele aspecto bastante fugaz da disposição radial dos espermatozóides e o aspecto poligonal dos oócitos maduros, no interior dos folículos, como foi verificado em *M. edulis* e *M. galloprovincialis*, (LUBET, 1959), *M. perna*, (LUNETTA, 1969), *A. brasiliana*, (NARCHI, 1976), *C. rhizophorae* (NASCIMENTO & LUNETTA, 1978) e *Lucina pectinata* (ASSIS, 1978), devido à rapidez com que se verificam os fenômenos de elaboração e de eliminação de gametas pelo bivalve *A. brasiliana* do litoral do Estado da Paraíba.

Tanto para os animais machos como para as fêmeas, caracterizamos um outro subestádio, o IIIBC. Neste ocorrem simultaneamente fenômenos de eliminação de gametas assim como de proliferação e maturação de células da linhagem germinativa.

Portanto nos subestádios IIIAB e IIIBC ocorrem fenômenos gametogênicos de proliferação, maturação, eliminação de gametas e recuperação das paredes foliculares corroborando a afirmação de GIESE (1959) de que a reprodução de animais que vivem próximos ao Equador apresentam períodos de reprodução prolongados e menos específicos.

Um fato importante a ressaltar refere-se ao subestádio IIIB, o qual somente pode ser determinado para os animais fêmeas e corresponde a uma fase de eliminação total de gametas. LUBET (1959), LUNETTA (1969), NARCHI (1976), ASSIS (1978) e NASCIMENTO & LUNETTA (1978), assinalam esta fase, em ambos os sexos.

A única fase que podemos assinalar como coincidente com os resultados obtidos para outros bivalves, já referidos anteriormente, é com relação ao subestádio IIIC, no qual se desenrolam os fenômenos gametogênicos de restauração dos folículos gonádicos, sendo preponderante o espessamento da parede folicular pela proliferação das células da linhagem germinativa.

Não encontramos subsídios histológicos para a caracterização do subestádio IIID na população de *A. brasiliana* por nós estudada.

Em resumo, podemos dizer que *A. brasiliana* do litoral do Estado da Paraíba reproduz-se intensivamente. Os animais, após terem atingido a maturidade sexual, apresentam um ciclo dinâmico de produção e eliminação de gametas. À medida que os gametas maduros vão sendo eliminados, o tecido conjuntivo interfolicular, assim como as células da parede dos folículos, células-mãe e gônias, entram em intensa divisão e especialização celular, havendo uma proliferação rápida e contínua das células da linhagem germinativa de forma que a gametogênese e a eliminação de gametas ocorrem concomitantemente.

Os fatos enumerados a seguir vêm corroborar as afirmações de GIESE (1959) e LUBET (1959) de que animais bem alimentados e em condições térmicas constantes apresentam um período de reprodução prolongado e contínuo: 1.º) o subestádio IIIAB é um estágio ativo de gametogênese intensa no qual ocorre, além desse fenômeno, a eliminação de oócitos e de espermatozoides para o meio exterior; 2.º) no subestádio IIIBC ocorre a eliminação de gametas, ao mesmo tempo em que está havendo uma proliferação das células da linhagem germinativa, em ambos os sexos, 3.º) não ocorre o subestádio IIID, que corresponde a uma pausa dos fenômenos reprodutivos; 4.º) o estágio O, que corresponde ao repouso sexual, não foi observado em nenhum animal.

Pela análise de nossos resultados, expressos nos gráficos das figuras C, D, e F podemos observar que houve um paralelismo na seqüência das fases do ciclo sexual dos animais machos e fêmeas com divergências somente em relação às percentagens dos diferentes estádios.

Pela análise destas percentagens, verificamos que, no período correspondente aos meses de agosto, setembro, outubro, novembro e dezembro, 94% das fêmeas, aproximadamente, e 100% dos machos, da população de *A. brasiliana* encontravam-se no subestádio IIIAB, portanto, produzindo e eliminando gametas ativamente. Nos meses de janeiro, fevereiro, março, abril, maio, junho e julho, 70% dos animais machos e 66% das fêmeas, com exceção dos meses de abril e maio, encontram-se no subestádio IIIBC, portanto, eliminando gametas e apresentando, simultaneamente os fenômenos de recuperação das gônadas. O subestádio IIIC atinge uma pequena percentagem de animais machos, porém, a percentagem deste subestádio é relevante para o caso das fêmeas as quais, de 96% e 51,4% da população encontram-se no subestádio IIIC, nos meses de abril e maio, respectivamente. Depreende-se, pelo exposto que a reprodução é contínua ao longo do ano, oscilando apenas o contingente de animais ativos, em um

ou outro estágio do ciclo reprodutivo exceção feita às fêmeas que, na 1.^a quinzena do mês de abril, apresentam unicamente animais em fase de recuperação das gônadas, isto é, no subestádio III C.

Parece-nos muito interessante o fato de que apenas, no mês de abril, detectamos uma percentagem significativa de fêmeas no subestádio III C. Segundo LUBET (1959) em temperaturas altas e constantes os fenômenos gametogênicos, que ocorrem nesta fase, são acelerados. Os processos gametogênicos, durante a oogênese, desenvolvem-se mais lentamente do que na espermatogênese, pois, nas diferentes fases da síntese do vitelo há necessidade de mobilização de reservas do animal. Embora não correspondendo absolutamente, ao repouso sexual mencionado para muitos bivalves, o subestádio III C pode propiciar às fêmeas uma fase de mobilização de substâncias energéticas para a progressão dos fenômenos gametogênicos, o que estaria de acordo com o proposto por LUBET (op. cit.) para *M. edulis* da Baía de Arcachon e por BOUCART (1964) para *M. galloprovincialis* nos quais há um sincronismo entre a diminuição da quantidade de glicogênio e a vitelogênese, fato este corroborado por WALNE (1970) e GABBOTT (1975). Além destes autores, CARMO & LUNETTA (1978) mencionam que o elevado nível de lípidos, encontrado em ambos os sexos de *P. perna*, no subestádio III C, poderia estar associado com a necessidade de uma grande quantidade dessas substâncias para a evolução dos fenômenos gametogênicos.

Em nossos estudos ficou comprovado que *A. brasiliana* apresenta um ciclo reprodutivo contínuo, isto é, os animais reproduzem-se durante o ano todo, sem que ocorra um período de repouso sexual. Esta situação, no dizer de GIESE & PEARSE (1974), ocorre em áreas onde se verificam pequenas diferenças sazonais dos fatores ambientais, tais como em regiões muito profundas do mar e determinadas regiões dos trópicos. Levando-se em consideração a temperatura e a salinidade medidas durante a realização das coletas de *A. brasiliana*, podemos observar que no transcurso do período de estudo, a primeira não oscilou além de 5°C e, ainda, isto jamais ocorreu de forma brusca, mais sim gradual. Quanto ao segundo parâmetro físico analisado, isto é, a salinidade, esta oscilou de um mínimo de 29^o/oo a um máximo de 34^o/oo porém, sem alterações bruscas. Estes fatos demonstram, para a região da Paraíba, uma estabilidade dos fatores ambientais considerados, corroborando a afirmação de GIESE & PEARSE (op. cit.), que nas regiões que se caracterizam pela estabilidade dos fatores ambientais, os animais marinhos tendem a apresentar um ciclo reprodutivo contínuo ao longo do ano, não havendo a influência seletiva de um determinado fator exógeno favorecendo a reprodução dos animais em uma época especial do ano.

Conforme ficou evidenciado pelos nossos resultados, embora não tenhamos informações pertinentes aos fatores bióticos ambientais, durante o período de estudo, parece-nos que a elevada temperatura da água do mar e sua relativa estabilidade, na região de coleta dos moluscos por nós utilizados, sejam os fatores preponderantes nas características do ciclo sexual deste bivalve ou seja, um subestádio III AB no qual já ocorre

eliminação de gametas e um ciclo reprodutivo contínuo ao longo do ano, aspectos estes em concordância com o que foi expresso por GIESE (1959). Nossos resultados relativos ao ciclo gametogênico de *A. brasiliana* parecem estar em consonância, também com o que foi verificado por WILSON & HODGKIN (1967) que afirmam ser a temperatura o fator abiótico mais importante no controle da extensão do período de reprodução de bivalves marinhos.

Assim, compreende-se que a população de *A. brasiliana* do litoral do Estado da Paraíba estando sujeita, naturalmente, a uma temperatura média anual de 27,6°C apresente uma eliminação contínua de gametas ao longo do ano corroborando a conclusão de MANN (1979) que a gametogênese depende não somente da temperatura mas, também, do tempo durante o qual os animais estão sujeitos a essa temperatura.

A. brasiliana é um molusco comestível, portanto, de interesse comercial e representa uma fonte de proteínas disponível sendo exaustivamente coletado pelo homem, durante a baixa-mar. Do ponto de vista ecológico, não poderíamos deixar de ressaltar a importância que assume um ciclo reprodutivo contínuo, isento das periodicidades dos fenômenos gametogênicos, ao longo do ano, assegurando uma renovação mais rápida e mais intensa do estoque de animais da população minimizando, em consequência, os efeitos da predação humana.

Outro aspecto abordado neste estudo refere-se à diferenciação das células da parede folicular, desde a célula-mãe até oócito maduro. Constatamos que as células-mãe e oogônias, nas fases iniciais de seu desenvolvimento, encontram-se envolvidas pelos prolongamentos do citoplasma das células foliculares sendo que estas, assim como nos moluscos *Mopalia mucosa* e *Chaetopleura apiculata* (ANDERSON, 1969) e *Loligo pealei* (SELMAN & ARNOLD, 1977), apresentam-se ricas em glicogênio.

O desenvolvimento da oogônia é acompanhada pelo aumento do volume das células foliculares, as quais apresentam um aumento da quantidade de organelas e uma maior síntese de substâncias. Quanto ao aporte de substâncias para o desenvolvimento das oogônias e suas fases subseqüentes é, ainda, um aspecto bastante controverso pois, segundo GALTSOFF (1964) a influência das células foliculares no desenvolvimento da gônada da ostra *Crassostrea virginica* é insignificante, atestando este autor que as células germinativas obtêm material nutritivo diretamente do tecido conjuntivo que as circunda. Talvez, em diferentes espécies de bivalves, as células foliculares e o tecido conjuntivo que circundam os folículos das gônadas assumam a função preponderante no aporte de alimentos para as células da linhagem germinativa. Tal fato viria corroborar o resultado encontrado por HILL (1977) de que as células foliculares em *Agriolimax reticulatus* são ativas na secreção e poderiam prover os oócitos, em desenvolvimento, de material nutritivo o que possibilitaria os fenômenos de vitelogênese e da formação do córion. Como em *A. brasiliana* comparativamente com o que ocorre em *M. edulis* e *M. galloprovincialis* (LUBET, 1959) em *M. perna* (LUNETTA, 1969) em *C. virginica* (GALTSOFF, 1964) e em *C. rhizophorae* (NASCIMENTO, 1978), o tecido conjuntivo

interfolicular é pouco desenvolvido, e dadas as relações verificadas entre as células foliculares e as células germinativas, parece-nos que as primeiras tem, realmente, importância no aporte de material nutritivo para as células.

Nos grânulos de vitelo dos oócitos de *A. brasiliana* foram detectadas substâncias P.A.S. positivas, resistentes à ação da alfa-amilase o mesmo ocorrendo no vitelo dos oócitos de *Anodonta* (BEAMS & SEKHON, 1966), *Chiton tuberculatum* (COWDEN, 1961), *Alloteuthis subulata* (BOTTKE, 1974), *Mopalia mucosa* (ANDERSON, 1969) e em *Loligo pealei* (SELMAN & ARNOLD, 1977).

Contrariamente ao verificado por BOLOGNARI, CARMIGNANI & ZACCONE (1976) não detectamos substâncias "Alcian-Blue" positivas no vitelo de *A. brasiliana* conforme foi, também, afirmado por COWDEN (1961) para *Chiton tuberculatum* e JONG-BRING *et al* (1976) em *Biomphalaria glabrata*.

Pelos resultados relativos a citoquímica dos aminoácidos, pudemos comprovar a existência dos radicais SS, SH e NH₂, o que confirma a presença de proteínas nos grânulos de vitelo dos oócitos de *A. brasiliana* conforme foi, também, observado no vitelo de *Biomphalaria glabrata* (JONG-BRING *et al*, 1976). Entretanto, BOLOGNARI, CARMIGNANI & ZACCONE (1976) afirmam que o vitelo de *Octopus vulgaris* é muito rico em sulfidril, tirosina e triptofano, e COWDEN (1961), assegura que o vitelo de *Chiton tuberculatum* contém grande quantidade de triptofano.

Nos oócitos, em vitelogênese I e II e maduros de *A. brasiliana* constatamos a ocorrência de substâncias lipídicas, tanto de caráter neutro como ácido predominando, contudo, a presença desses últimos. Em base às técnicas empregadas, podemos concluir que as substâncias lipídicas neutras referem-se, provavelmente, a triglicérides e as ácidas, a fosfolípidos. Os oócitos de *C. rhizophorae* em curso de vitelogênese e maduros também apresentam essa composição lipídica (NASCIMENTO, 1978). Inúmeros outros autores embora registrem a presença de lípidos no vitelo de oócitos de outros moluscos, não mencionam o caráter químico dos mesmos (BRETSCHNEIDER & RAVEN, 1951; LUBET, 1959; LUNETTA, 1969; POPHAN, 1975 e SCHMEKEL & FIORONI, 1975).

Concluimos que o vitelo dos oócitos de *A. brasiliana* é constituído de grânulos de natureza glicoprotéica entrando, ainda, na composição do vitelo, lípidos de caráter ácido e neutro.

TABELA I – Datas de realização das coletas de *A. brasiliense*. Quantidade de animais coletados, segundo os sexos e valores do "sex-ratio" da população estudada, em cada período de coleta.

MÊS / ANO	FÊMEAS		MACHOS		N	"SEX-RATIO"
	n	%	n	%		
4 SET.77	19	47,5	21	52,5	40	1,1
18 SET.77	18	45,0	22	55,0	40	1,2
2 OUT.77	21	52,5	19	47,5	40	0,9
16 OUT.77	20	50,0	20	50,0	40	1,0
30 OUT.77	21	52,5	19	47,5	40	0,9
13 NOV.77	22	52,4	20	47,6	42	0,9
27 NOV.77	14	34,1	27	65,9	41	1,9
11 DEZ.77	23	56,1	18	43,9	41	0,8
25 DEZ.77	23	53,5	20	46,5	43	0,9
8 JAN.78	19	46,3	22	53,7	41	1,1
22 JAN.78	17	44,7	21	55,3	38	1,2
5 FEV.78	23	60,5	15	39,5	38	0,6
19 FEV.78	19	47,5	21	52,5	40	1,1
5 MAR.78	18	45,0	22	55,0	40	1,2
19 MAR.78	23	56,1	18	43,9	41	0,8
2 ABR.78	18	45,0	22	55,0	40	0,8
16 ABR.78	20	50,0	20	50,0	40	1,0
30 ABR.78	17	43,6	22	56,4	39	1,3
14 MAI.78	23	46,0	27	54,0	50	1,2
28 MAI.78	15	34,9	28	65,1	43	1,9
11 JUN.78	25	56,8	19	43,2	44	0,8
26 JUN.78	22	53,4	20	47,6	42	0,9
9 JUN.78	20	50,0	20	50,0	40	1,0
23 JUL.78	19	47,5	21	52,5	40	1,1
6 AGO.78	18	45,0	22	55,0	40	1,2
20 AGO.78	16	40,0	24	60,0	40	1,5
3 SET.78	20	50,0	20	50,0	40	1,0
17 SET.78	18	46,0	22	54,0	40	1,1
TOTAL	551	48,2	592	51,8	1143	

TABELA II — Volume, em μm^3 , do citoplasma, do núcleo e relação núcleo plasmática, em porcentagem, das células da linhagem germinativa de animais fêmeas de *A. brasiliense*.
N = 30 células

CÉLULA GERMINATIVA	CITOPLASMA (μm^3)		NÚCLEO (μm^3)		RELAÇÃO N/P (%)	
	(\bar{X})	(S)	(\bar{X})	(S)	(\bar{X})	(S)
Células-mãe	1.021,6	265,3	214,4	89,7	20,4	4,5
Oogônias	4.121,8	1.920,3	845,3	305,8	22,5	6,9
Oócitos basófilos	7.164,8	3.435,9	1.087,7	403,1	16,3	4,8
Oócitos pré-vitelogênese	18.489,5	5.714,5	3.157,8	1.545,2	17,4	5,2
Oócitos vitelogênese	71.981,4	20.263,9	9.348,9	3.311,4	13,2	3,7

TABELA III - Volume do núcleo, em μm^3 , das células da linhagem germinativa dos machos de *A. brasiliense* N = 30 células.

CÉLULA GERMINATIVA	NÚCLEO (μm^3)	
	(\bar{X})	(S)
Células-mãe	225,3	50,9
Espermatogônias	81,7	13,2
Espermatócitos de 1a.	30,0	4,7
Espermatócitos de 2a.	3,9	0,4
Espermátides	1,8	0,3

TABELA IV - *A. brasiliense*. Fêmeas. Distribuição bissemanal das frequências absolutas (n) e relativas (%) das fases do ciclo sexual da população estudada (N = n.^o de indivíduos analisados).

MÊS / ANO	N	ESTÁDIOS DO CICLO SEXUAL							
		IIIAB		IIIBC		IIIB		IIIC	
		n	%	n	%	n	%	n	%
4 SET.77	19	19	100,0	—	—	—	—	—	—
18 SET.77	18	16	88,9	2	11,1	—	—	—	—
2 OUT.77	21	19	90,5	2	9,5	—	—	—	—
16 OUT.77	20	18	90,0	2	10,0	—	—	—	—
31 OUT.77	21	19	90,5	2	9,5	—	—	—	—
13 NOV.77	22	22	100,0	—	—	—	—	—	—
27 NOV.77	14	14	100,0	—	—	—	—	—	—
11 DEZ.77	23	21	91,3	2	8,7	—	—	—	—
25 DEZ.77	23	21	91,3	2	8,7	—	—	—	—
8 JAN.78	19	8	42,1	8	42,1	1	5,3	2	10,5
22 JAN.78	17	—	—	11	64,7	1	5,9	5	29,4
5 FEV.78	23	—	—	19	82,6	—	—	4	17,4
19 FEV.78	19	—	—	17	89,5	—	—	2	10,5
5 MAR.78	18	—	—	15	83,3	—	—	3	16,7
19 MAR.78	23	—	—	7	30,4	—	—	16	69,6
2 ABR.78	18	—	—	—	—	—	—	18	100,0
16 ABR.78	20	—	—	—	—	—	—	20	100,0
30 ABR.78	17	—	—	—	—	2	11,7	15	88,3
14 MAI.78	23	—	—	3	13,0	4	17,4	16	69,6
28 MAI.78	15	—	—	6	40,0	4	26,7	5	33,3
11 JUN.78	25	—	—	8	32,0	4	16,0	13	52,0
25 JUN.78	22	—	—	11	50,0	7	31,8	4	18,2
9 JUL.78	20	4	20,0	14	70,0	—	—	2	10,0
23 JUL.78	19	18	94,7	1	5,3	—	—	—	—
6 AGO.78	18	18	100,0	—	—	—	—	—	—
20 AGO.78	16	16	100,0	—	—	—	—	—	—
3 SET.78	20	20	100,0	—	—	—	—	—	—
17 SET.78	18	17	94,4	1	5,6	—	—	—	—

TABELA V – *A. brasiliense*. Machos. Distribuição bissetimaneal das frequências absolutas (n) e relativas (%) das fases do ciclo sexual da população estudada (N = n^o de indivíduos analisados).

MÊS / ANO	N	ESTÁDIOS DO CICLO SEXUAL					
		IIIAB		IIIBC		IIIC	
		n	%	n	%	n	%
4 SET.77	21	21	100,0	—	—	—	—
18 SET.77	22	22	100,0	—	—	—	—
2 OUT.77	19	19	100,0	—	—	—	—
16 OUT.77	20	20	100,0	—	—	—	—
30 OUT.77	19	19	100,0	—	—	—	—
13 NOV.77	20	20	100,0	—	—	—	—
27 NOV.77	27	27	100,0	—	—	—	—
11 DEZ.77	18	18	100,0	—	—	—	—
25 DEZ.77	20	20	100,0	—	—	—	—
8 JAN.78	22	22	100,0	—	—	—	—
22 JAN.78	21	7	33,3	14	66,7	—	—
5 FEV.78	15	6	40,0	9	60,0	—	—
19 FEV.78	21	2	9,5	19	90,5	—	—
5 MAR.78	22	6	27,3	15	68,2	1	4,5
19 MAR.78	18	12	66,7	5	27,8	1	5,5
2 ABR.78	22	4	18,2	17	77,3	1	4,5
16 ABR.78	20	2	10,0	16	80,0	2	10,0
30 ABR.78	22	2	9,1	18	81,8	2	9,1
14 MAI.78	27	1	3,7	16	57,3	10	37,0
28 MAI.78	28	4	14,3	19	67,8	5	17,9
11 JUN.78	19	4	21,0	15	79,0	—	—
25 JUN.78	20	—	—	20	100,0	—	—
9 JUL.78	20	4	20,0	16	80,0	—	—
23 JUL.78	21	12	57,1	9	42,9	—	—
6 AGO.78	22	19	86,3	3	13,7	—	—
20 AGO.78	24	21	87,5	3	12,5	—	—
3 SET.78	20	20	100,0	—	—	—	—
17 SET.78	22	22	100,0	—	—	—	—

TABELA VI – Valores da temperatura ($t^{\circ}\text{C}$) e da salinidade ($^{\circ}/\text{oo}$) durante as coletas de *A. brasiliiana* na "Praia do Costinha" ($6^{\circ}57'45''\text{S}$; $34^{\circ}51'28''\text{W}$) município de Lucena, Litoral do Estado da Paraíba.

MÊS / ANO	ÁGUA INTERSTICIAL	
	$t^{\circ}\text{C}$	$^{\circ}/\text{oo}$
4 SET.77	26	32
18 SET.77	27	32
2 OUT.77	27	33
16 OUT.77	27	32
30 OUT.77	29	33
13 NOV.77	29	32
27 NOV.77	29	32
11 DEZ.77	30	34
25 DEZ.77	30	34
8 JAN.78	30	34
22 JAN.78	30	34
5 FEV.78	30	33
19 FEV.78	30	32
5 MAR.78	30	30
19 MAR.78	28	30
2 ABR.78	29	30
16 ABR.78	29	31
30 ABR.78	28	32
14 MAI.78	27	32
28 MAI.78	26	31
11 JUN.78	25	30
25 JUN.78	25	30
9 JUL.78	25	29
23 JUL.78	25	29
6 AGO.78	25	30
20 AGO.78	26	30
3 SET.78	26	31
17 SET.78	26	31

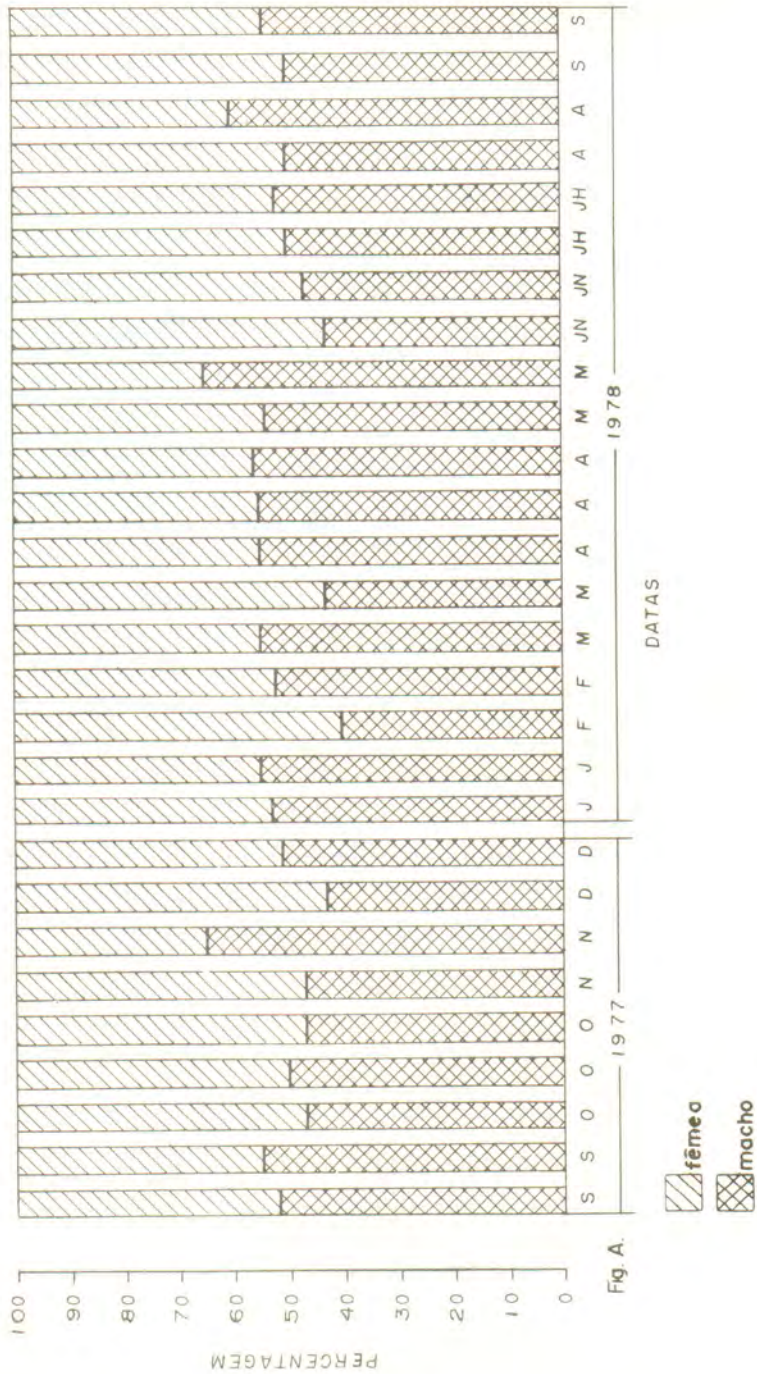


Fig. A. — Percentagens de animais fêmeas e machos coletados na praia do "Costinha" — Município de Lucena — PB, no período indicado.

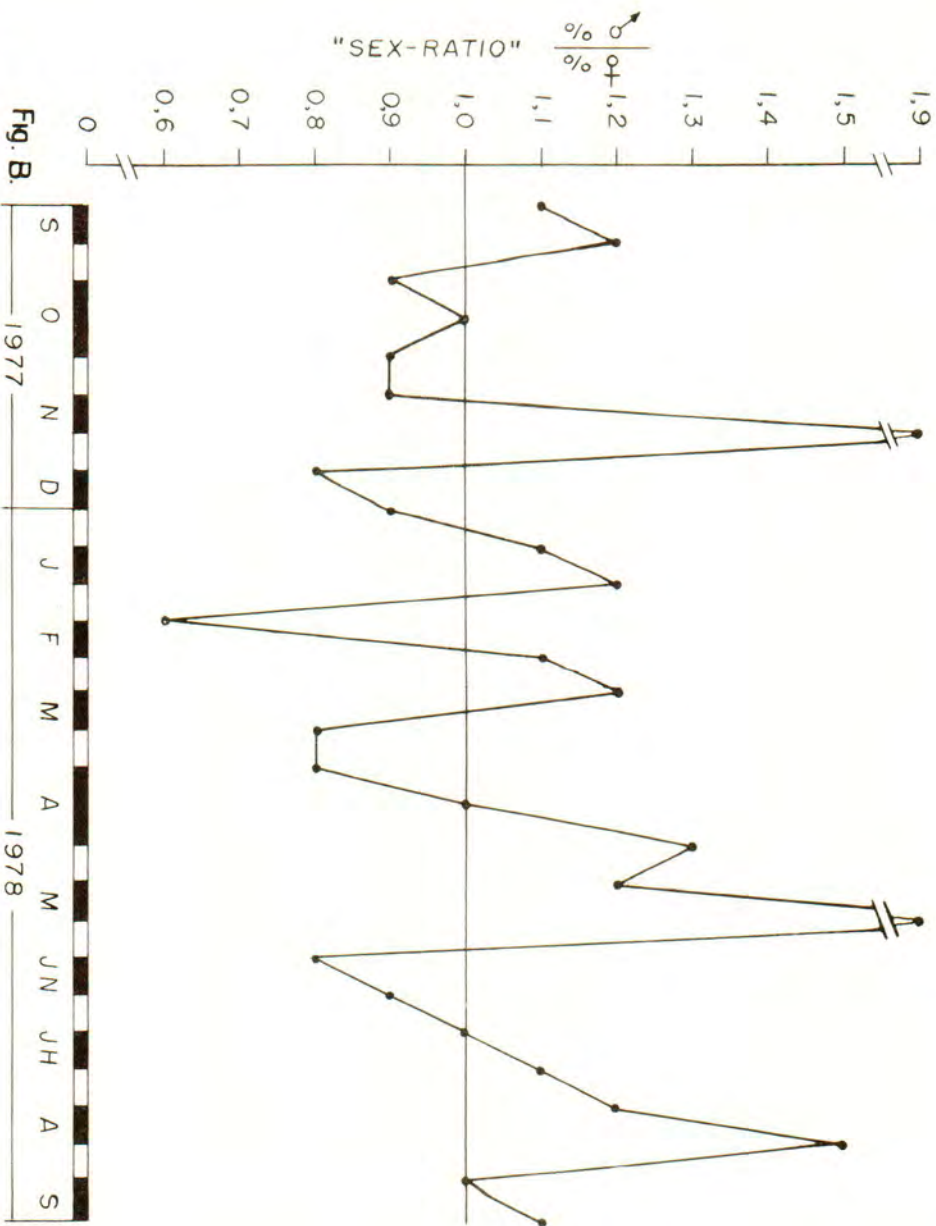


FIG. B — "Sex-ratio" da população de *A. brazilliana* coletadas na praia do "Costinha" — Município de Lucena — PB, no período indicado.

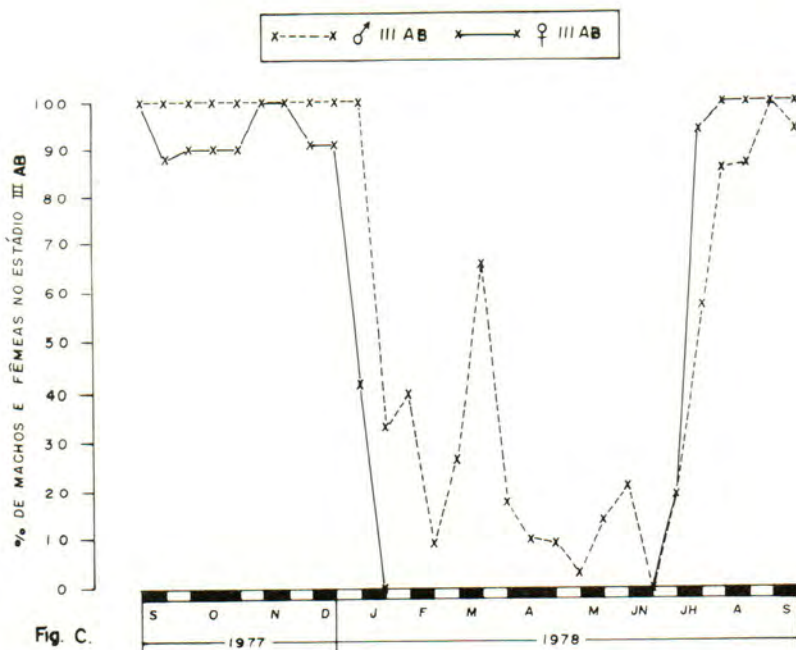


FIG. C — Variação mensal das percentagens de animais machos e fêmeas no estágio sexual III AB.

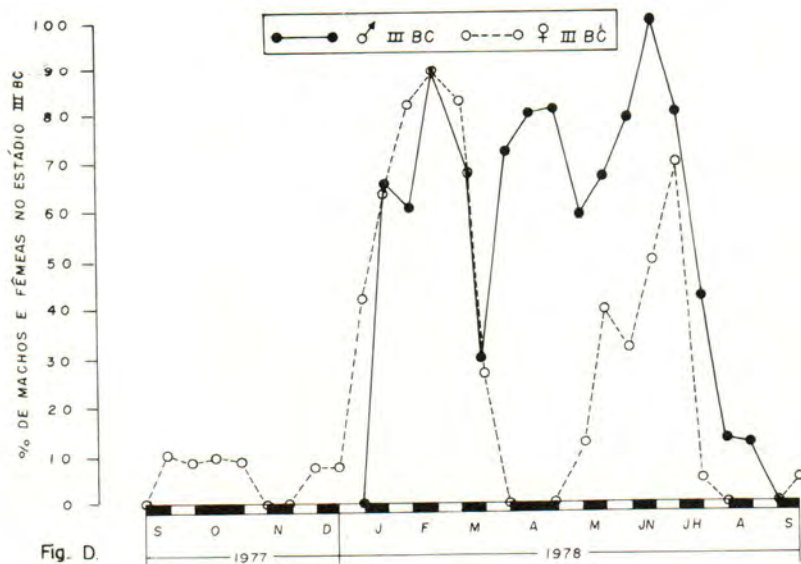


FIG. D — Variação mensal das percentagens de animais machos e fêmeas no estágio sexual III BC.

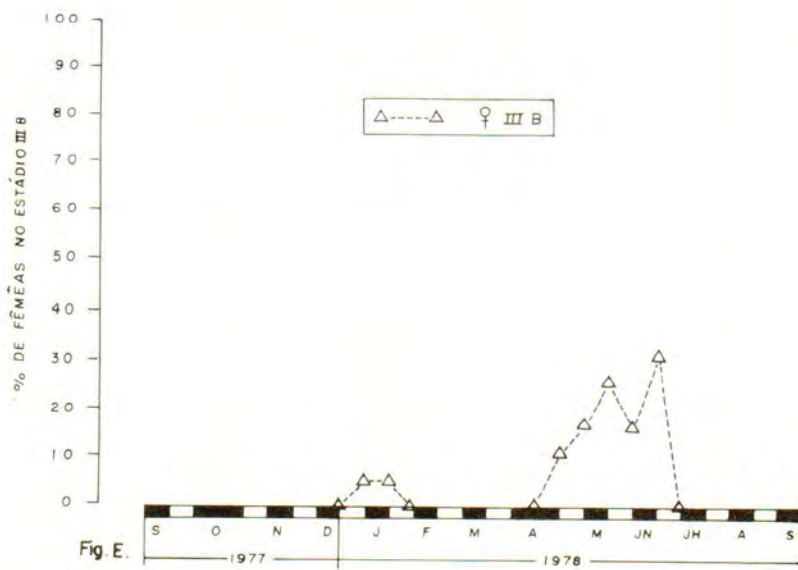


FIG. E — Variação mensal das percentagens de animais fêmeas no estágio sexual III B.

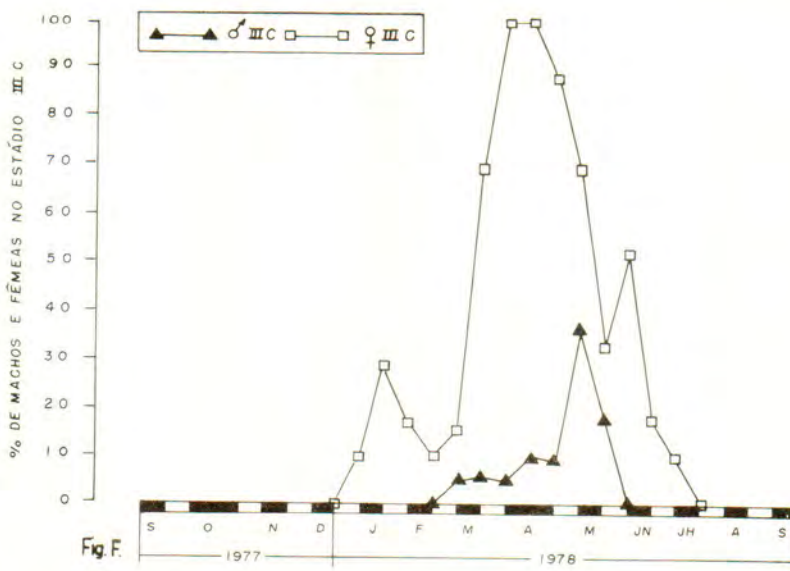
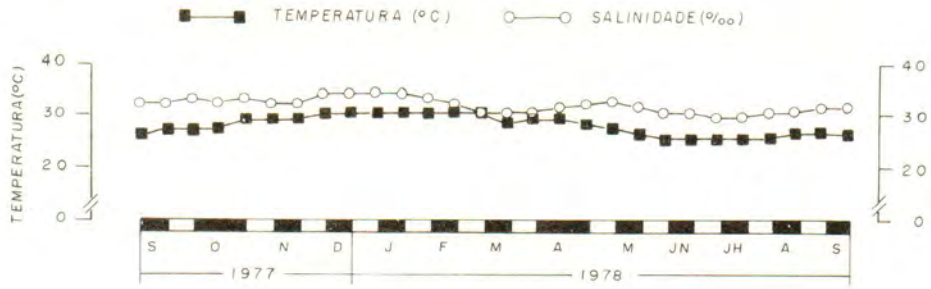


FIG. F — Variação mensal das percentagens de animais machos e fêmeas no estágio sexual III C.



LEGENDA

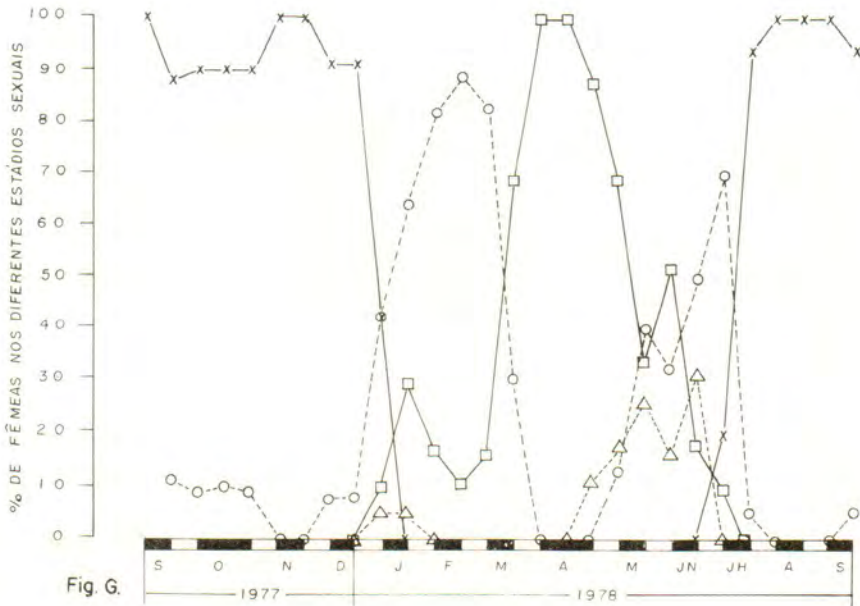
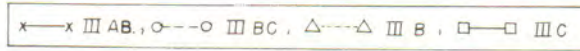
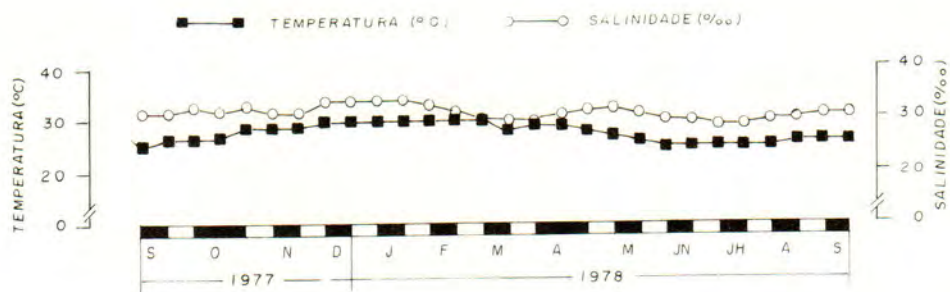


Fig. G.

FIG. G — Salinidade, temperatura e distribuição das percentagens de animais fêmeas nos estádios sexuais IIIAB, IIIBC, IIIB e IIIC, nas diferentes épocas de coletas.



LEGENDA

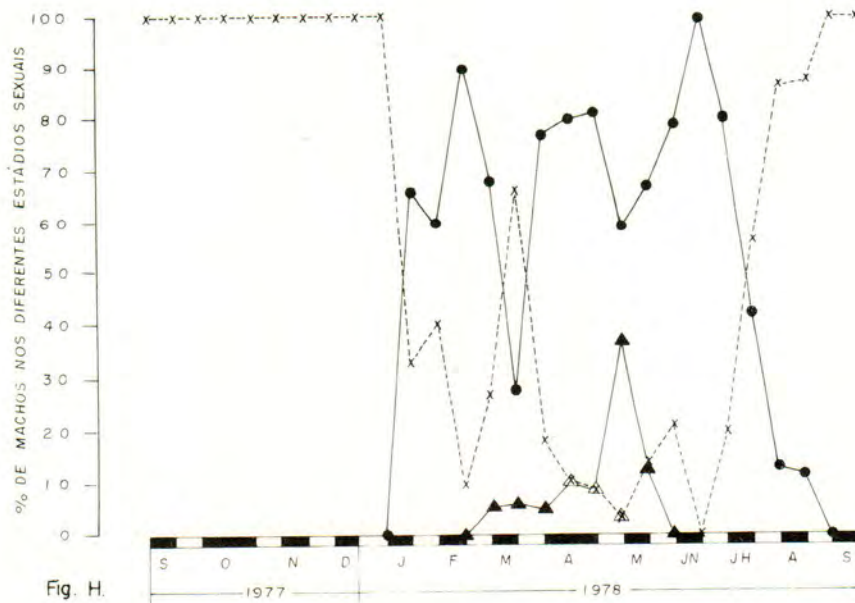


Fig. H.

FIG. H — Salinidade, temperatura e distribuição das percentagens de animais machos nos estádios sexuais IIIAB, IIIBC e IIIC, nas diferentes épocas de coletas.

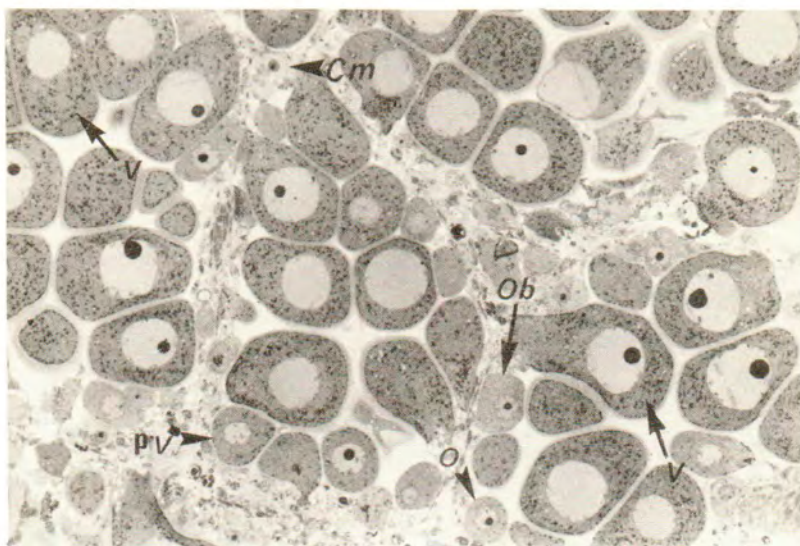


FIG. 1 - *A. brasiliana* fêmea. Ácinos gonádicos mostrando aspectos da oogênese. Corte em Araldite, corado pelo azul de metileno + azur II. Cm = célula mãe; O = oogônia; Ob = oócito basófilo; pV = oócito em pré-vitelogênese; V = oócito em vitelogênese. Aumento = ± 600 x.

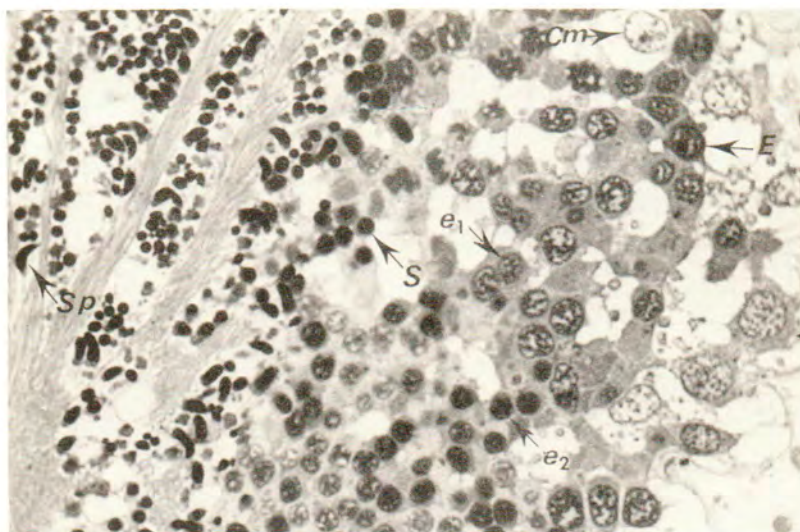
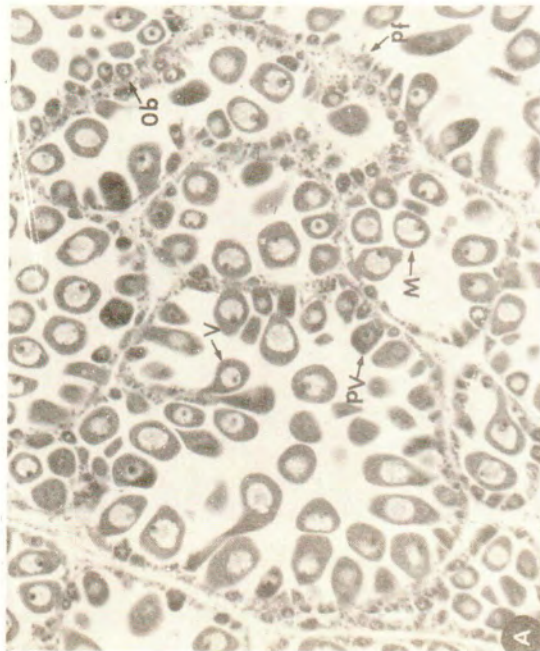
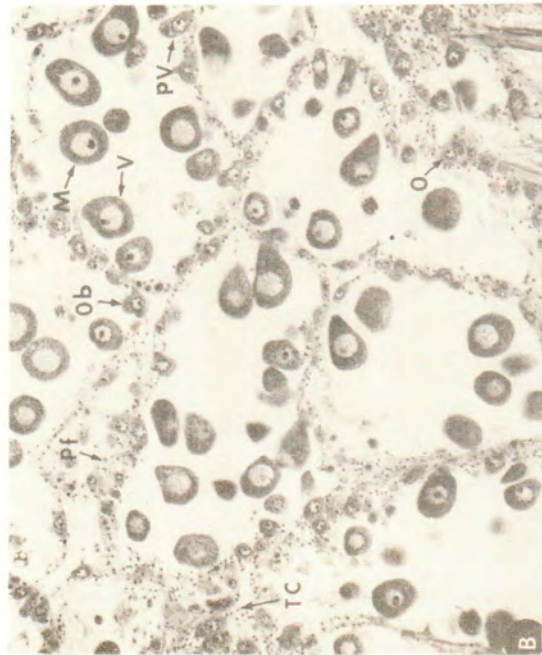


FIG. 2 - *A. brasiliana* macho. Ácino mostrando aspectos da espermatogênese. Corte em Araldite, corado pelo azul de metileno + azur II. Cm = célula-mãe; E = espermatogônia; e₁ = espermatócito de 1.^a ordem; e₂ = espermatócito de 2.^a ordem; S = espermatíde; Sp = espermatozóide. Aumento = ± 1.600 x.



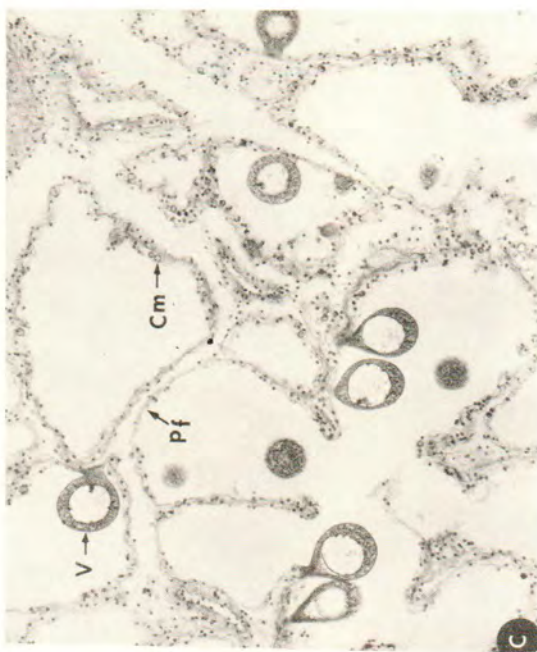
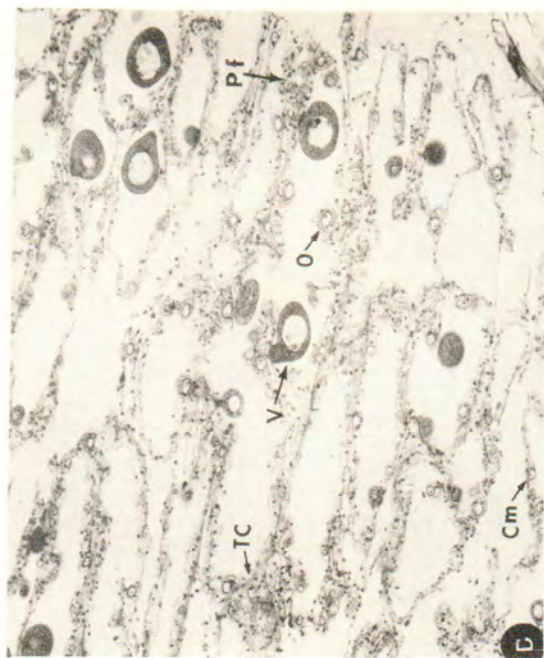
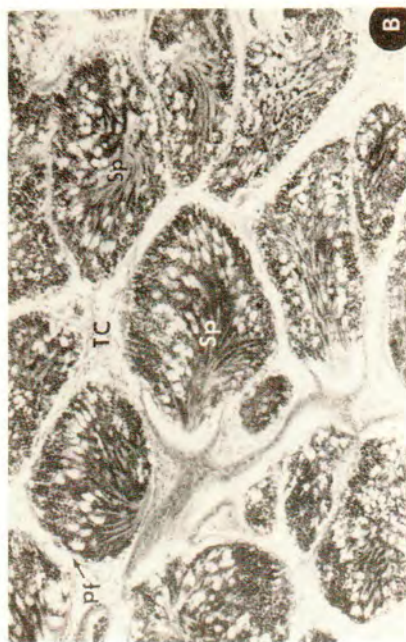


FIG. 3 - *A. brasiliense*. Gônadas de animais fêmeas em diferentes estádios do ciclo sexual. Cortes em parafina, corados pelo H.E. A, B, C e D = animais nos estádios sexuais III AB, III BC, IIIB e III C, respectivamente. pf = parede folicular; Cm = oócito-mãe; O = oogônia; Ob = oócito basófilo; pV = oócito em pré-vitelogênese; V = oócito em vitelogênese. M = oócito maduro; TC = tecido conjuntivo. Aumento = $\pm 120 \times$.



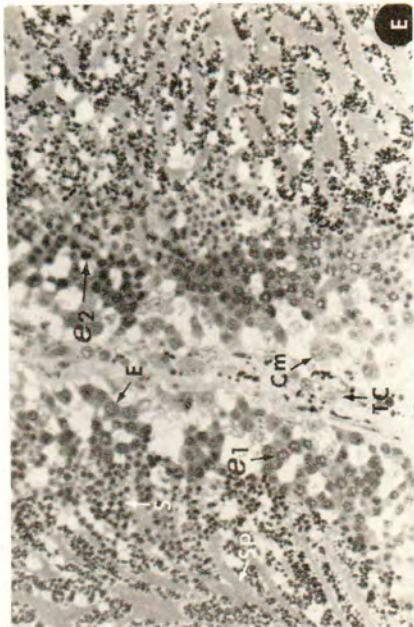
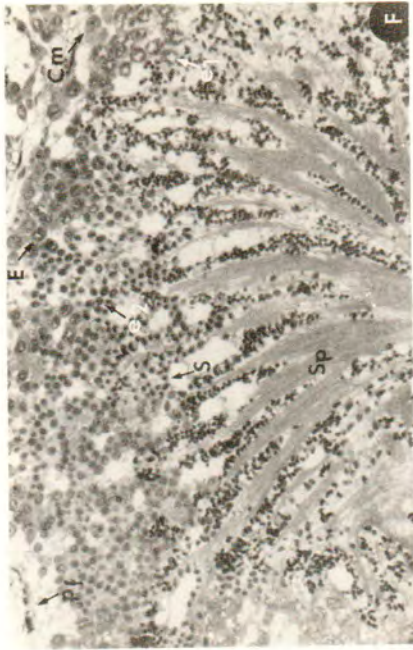


FIG. 4 - *A. brasiliense*. Gónadas de animais machos em diferentes estádios do ciclo sexual. A, B e C = animais nos estádios sexuais III AB, III BC e III C, respectivamente. Cortes em parafina, corados pelo H. E. Aumento = $\pm 80 \times$. D, E e F = porrenor de folículos de animais nos estádios sexuais III AB, III BC e III C, respectivamente. Cortes em Araldite, corados pelo azul de Metileno + azul II. Aumento = $\pm 320 \times$. Cm = célula-mãe; E = espermatogônia; e₁ = espermátócito de 1.^a ordem; e₂ = espermátócito de 2.^a ordem; S = espermátide; Sp = espermatozóide.



FIG. 5 - *A. brasiliana*. fêmea. Aspecto histológico da gônada. Corte em parafina, corado pelo H. E. C = citoplasma; N = núcleo; n = anfinucléolo; setas = núcleo de células foliculares; TC = tecido conjuntivo. Aumento = ± 640 x.



FIG. 6 - *A. brasiliana*. Células da linhagem germinativa feminina evidenciando as modificações que precedem a síntese de vitelo em células-mãe (Cm); oogônias (O) e oócitos basófilos (Ob), com posterior deposição de vitelo nos oócitos em vitelogênese I (V_1) e em vitelogênese II (V_2). Cortes em Araldite, corados pelo azul de metileno + azur II. Aumento = ± 2.000 x.



FIG. 7 - *A. brasiliana*. Aspectos das células da linhagem germinativa feminina evidenciando o aumento da basofilia citoplasmática na oogônia (O) e oócito basófilo (Ob); formação de "escamas" perinucleares nos oócitos em pré-vitelogênese (pV). Observa-se a "aparente" redução da basofilia no oócito em vitelogênese I (V_1) e maduro (M). Cortes em parafina, corados pelo galocianina com pH 1,6. Aumento = $\pm 800 \times$.

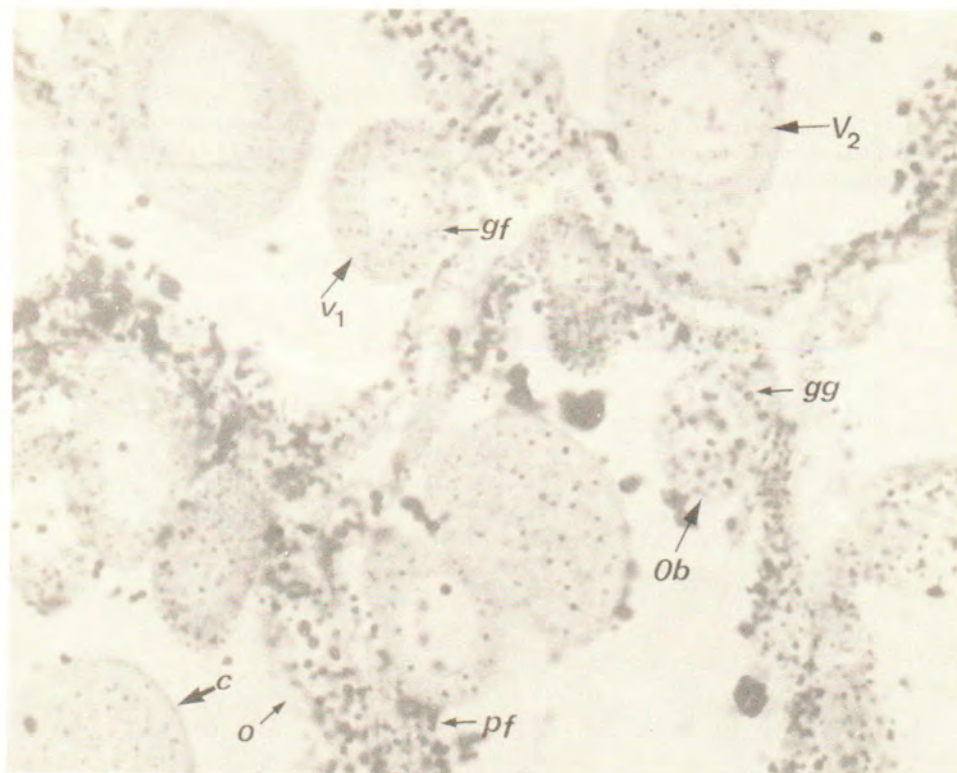


FIG. 8 - Fotomicrografia dos folículos gonádicos de *A. brasiliana* fêmea apresentando material P.A.S. positivo sob a forma de: granulação grossa (gg) nas células foliculares que constituem a parede folicular (pf) e nas que envolvem a oogônia (O) e o oócito basófilo (Ob); granulação fina (gf) nos oócitos em vitelogênese I (V_1) e em vitelogênese II (V_2); material homogeneamente P.A.S. positivo no corion (c). Aumento = $\pm 700 \times$.

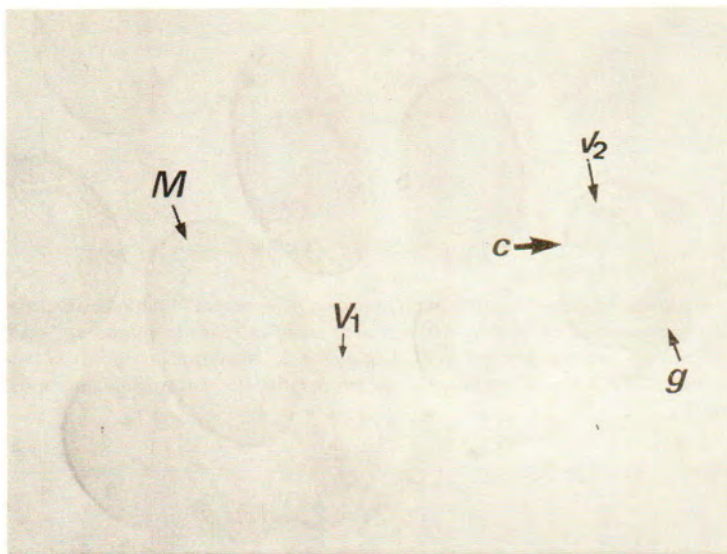


FIG. 9 – Fotomicrografia do ácido gonádico de *A. brasiliana* fêmea apresentando material "Alcian-Blue" positivo no citoplasma (g) e no córion (c) de oócitos em vitelogênese I (V_1), em vitelogênese II (V_2) e maduros (M). Aumento = ± 700 x.

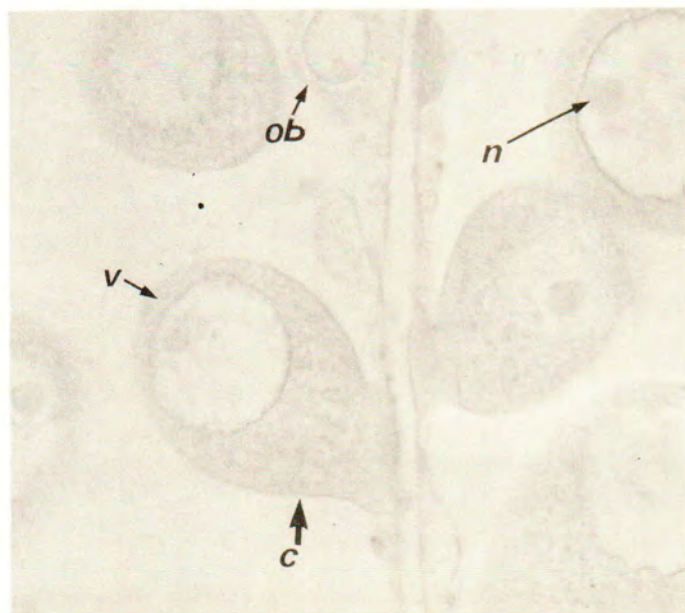


FIG. 10 – Fotomicrografia do ácido gonádico de *A. brasiliana* fêmea mostrando o material positivo ao método do ferricianeto férrico para radicais sulfidrila (SH). (Ob) = oócito basófilo; (V) = oócito em vitelogênese; (n) = anucleado; (c) = córion. Aumento = ± 700 x.

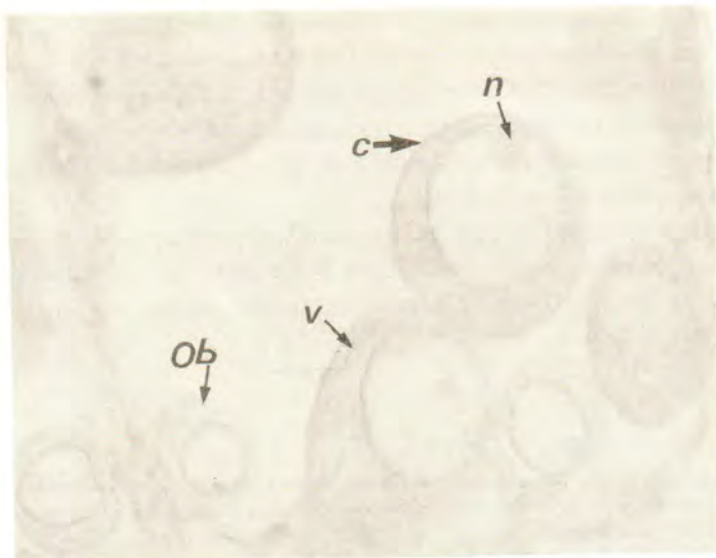


FIG. 11 – Fotomicrografia do ácino gonádico de *A. brasiliana* fêmea evidenciando o material positivo ao método do ferricianeto férrico para grupamentos dissulfeto (SS), após a redução. (Ob) = oócito basófilo; (V) = oócito em vitelogênese; (n) = anfinucléolo; (c) = córion. Aumento = $\pm 700 \times$.

CONCLUSÕES

- 1) Os animais estudados foram coletados em uma região que se caracteriza por apresentar fatores ambientais relativamente estáveis, tais como a salinidade e a temperatura.
- 2) Os animais machos apresentam três subestádios sexuais: IIIAB, IIIBC e IIIC; enquanto que as fêmeas apresentam quatro: IIIAB, IIIBC, IIIB e IIIC. Tanto os animais machos quanto as fêmeas, no subestádio IIIAB, produzem e eliminam gametas. O subestádio IIIC é mais freqüente nos animais fêmeas.
- 3) Desde meados de julho até meados de janeiro, portanto, abrangendo meses de inverno, primavera e verão, praticamente, toda população se encontra no subestádio IIIAB, nos meses de fevereiro, março, abril, maio e junho os animais fêmeas se encontram nos subestádios IIIBC e/ou IIIB e/ou IIIC e os animais machos nos subestádios IIIAB, IIIBC e/ou IIIC.
- 4) De uma forma geral ocorre um paralelismo na seqüência das fases do ciclo sexual de animais machos e fêmeas verificando-se, apenas, divergências de percentagens nos diferentes subestádios.
- 5) Os animais eliminam gametas o ano todo, reproduzindo-se continuamente.
- 6) Em decorrência das diferenças morfo-funcionais que ocorrem durante a oogênese.

se, estabelecemos as seguintes fases. 1 – Célula-mãe; 2 – oogônia; 3 – oócito basófilo; 4 – oócito em pré-vitelogênese; 5 – oócitos em vitelogênese I e II e, 6 – oócito maduro.

7) As células foliculares desempenham importante função nas fases iniciais do desenvolvimento do oócito, degenerando-se no final da fase de vitelogênese.

8) O tecido conjuntivo interfolicular é sempre muito reduzido, em ambos os sexos, em todos os subestádios do ciclo sexual.

9) Os resultados dos estudos citoquímicos nos permitem afirmar que os grânulos de vitelo de *A. brasiliana* contém substâncias P.A.S. positivas, resistentes à ação da alfa-amilase; não contém substâncias "AB" positivas; contém radicais SS, SH e NH₂ e lípidos tanto de caráter ácido como neutro.

RESUMO

No presente trabalho pesquisamos o ciclo sexual do bivalve marinho *Anomalocardia brasiliana*, do litoral do Estado da Paraíba. O estudo seqüencial das fases do ciclo sexual indicam que os animais eliminam gametas o ano todo.

A célula germinativa feminina passa por uma fase proliferativa e outra de crescimento na qual sofre alterações morfo-funcionais bastante específicas.

O tecido conjuntivo interfolicular é pouco desenvolvido; as células foliculares estão relacionadas com o desenvolvimento das células germinativas.

O deutoplasma é constituído de grânulos de natureza glicoprotéica e de gotículas lipídicas de caráter ácido e neutro.

SUMMARY

This study has investigated reproductive cycle of the marine bivalve *Anomalocardia brasiliana* from the littoral of the State Paraíba, Brazil. We have established that males and females release their gametes throughout the year, showing therefore, a continuous sexual cycle.

Female germinative cells have a proliferating and a growing phase with specific morpho-functional changes.

The interfollicular connective tissue is always very reduced.

The follicular cells are related to the initial phases of oocyte development. The deutoplasm comprises glycoproteic granules and lipid droplets of acid and neutral character.

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, E. 1969. Oocyte-follicle cell differentiation in two species of Amphineurans (Mollusca), *Mopalia mucosa* and *Chaetopleura apiculata*. *J. Morph.*, 129: 89-126.
- ANDRÉU, B. 1976. El cultivo del mejillón en Europa. I. Metodos y técnicas utilizados. *Anais Acad. bras. Cienc.*, 47 (Supl.): 11-22.
- ANSELL, A. D. 1961. Reproduction, growth and mortality of *Venus striatula* (da Costa) in Kames Bay, Millport. *J. mar. Biol. Ass. U.K.*, 41: 191-215.
- ASSIS, R.C.F. 1978. *Anatomia funcional de Lucina pectinata* (Gmelin, 1791) (Bivalvia – Lucinidae) um subsídio ao conhecimento do ciclo sexual. São Paulo, Instituto de Biociências. 93p. Tese (Doutoramento) Dept.^o de Zoologia do Instituto de Biociências da USP.

- BAKER, J.R. 1946. The histochemical recognition of lipids. *Quart. J. microsc. Sci.*, **87**: 441-470.
- BARKA, T. & ANDERSON, P. J. 1963. Apud PEARSE, A.G.E. 1968.
- BARNES, H. & BARNES, M. 1967. The effect of starvation and feeding on the time of production of egg masses in the boreoartic cirripede *Balanus balanoides*. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* **1**: 1-6. Apud Giese & Pearse 1974.
- BAYNE, B.L.; MOORE, M.N.; LOWE, D.M.; WIDDOWS, J. 1978. Further studies on the effects of stress in the adult on the eggs of *Mytilus edulis*. *J. mar. Biol. Ass. U.K.*, **58** (4): 825-841.
- BEAMS, H.W. & SEKHON, S.S. 1966. Electron microscope studies on the oocyte of the fresh-water mussel (Anodonta), with special reference to the stalk and mechanism of yolk deposition. *J. Morph.*, **119**: 477-501.
- BOLOGNARI, A.; CARMIGNANI, M.P.A. & ZACCONE, G. 1976. A cytochemical analysis of the follicular cells and the yolk in the growing oocytes of *Octopus vulgaris* (Cephalopoda, Mollusca). *Acta Histochem.*, **55** (2): 167-175.
- BOTTKE, W. 1974. The fine structure of the ovarian follicle of *Alloteuthis subulata* Lam. (Mollusca, Cephalopoda). *Cell Tiss. Res.*, **150** (4): 463-479.
- BOUCART, C. 1964. *Recherches préliminaires sur le cycle annuel du glycogène chez Mytilus gallo-provincialis*. Editions de l'âge 20; Rue François Garcin Lyon. 3.
- BRACHET, J. 1939. Apud LISON, L. 1960.
- BRETSCHNEIDER, L.H. & RAVEN, C.P. 1951. Structural and topochemical changes in the egg cells of *Limnaea stagnalis* L. during oogenesis. *Arch. néerl. Zool.*, **10**: 1-31.
- BUTTLER, P.A. 1949. Gametogenesis in the oyster under conditions of depressed salinity. *Biol. Bull. mar. biol. Lab. Woods Hole*, **96**: 263-269.
- CARMO, T.M.S. do & LUNETTA, J.E. 1978. Changes in the lipid level of *Perna perna* (Linné, 1758) (Mollusca-Bivalvia) related to sex and sexual stages. *Bolm. Fisiol. Animal. Univ. S. Paulo*, **2**: 49-62.
- CHAMBERS, M.R. & MILNE, H. 1979. Seasonal variation in the condition of some intertidal invertebrates of the Ythan Estuary, Scotland. *Estuar. Coast. mar. Sci.*, **8**: 411-419.
- CHEVREMONT, M. & FRÉDERIC, J. 1943. Une nouvelle méthode histochimique de mise en évidence des substances à fonction sulphydryle. *Archs Biol.*, **54**: 589-605.
- CHIPPERFIELD, P.N.J. 1953. Observations on the breeding and settlement of *Mytilus edulis* (L) in British waters. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, **32**, 449-476.
- COE, W.R. 1932. Development of the gonads and the sequence of the sexual phases in the California oyster (*Ostrea lurida*). *Scripps Inst. Oceanogr.*, Univ. California, **31** (6): 119-144.
- COWDEN, R.R. 1961. A cytochemical investigation of oogenesis and development to the swimming larval stage in the chiton, *Chiton tuberculatum*. *Biol. Bull. mar. biol. Lab. Woods Hole*, **120**: 313-325.
- DE VILLIERS, G. 1975. Reproduction of the white sand mussel *Donax serra* Röding. *Sea Fish. Branch Investl. Rep.*, **102**: 1-33.
- DEMPSEY, E.W. & WISLOCKI, G.B. 1946. Histochemical contributions to physiology. *Physiol. Rev.*, **26** (1): 1-27.
- EINARSON, L. 1951. On the theory of gallocyanin-chromalum staining and its applications for quantitative estimation of basophilia. A selective staining of exquisite progressivity. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **28**: 82.
- FISHER, E.R. & LILLIE, R.D. 1954. The effect of methylation on basophilia. *J. Histochem.*, **2** (2): 81-87.
- FRETTER, V. & GRAHAM, A. 1964 — Reproduction. In: *Physiology of mollusca*. WILBUR, K.M. & YONGE C.M. (Eds) New York; Academic Press: 473 pp.
- GABBOTT, P.A. 1975. Storage cycles in marine bivalve mollusc: a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. In: BARNES, H. ed. *Proceedings 9th European Marine Biology Symposium*. Aberdeen, Aberdeen University Press. p. 191-211.
- GALTSOFF, P.S. 1964. The american oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Fishery Bull. Fish Wilds. Serv. U.S.*, **64**: 1-480.

- GIESE, A.C. 1959. Comparative physiology: annual reproductive cycles of marine invertebrates. *A. Rev. Physiol.*, 21: 547-576.
- GIESE, A.C. & PEARSE, J.S. 1974. Introduction: General Principles. In: GIESE, A.C. & PEARSE, J.S. ed. *Reproduction of marine Invertebrates*. New York, Academic Press, v. 1, p. 1-49.
- HALE, A.J. 1957. The histochemistry of polysaccharides. *Int. Rev. Cytol.*, 6: 193-263.
- HALL, C.A. 1964. Shallow-water marine climates and molluscan provinces. *Ecology*, 45 (2): 226-234.
- HILL, R. S. 1977. Studies on the ovotestis of the slug *Agriolimax reticulatus* (Müller). 2. The epithelia. *Cell Tiss. Res*, 183 (3): 131-142.
- JONG-BRINK, M.; A.; KRAAL, G. & BOER, H.H. 1976. A light and electron microscope study on oogenesis in the freshwater pulmonate snail *Biomphalaria glabrata*. *Cell Tiss. Res.*, 171 (2): 195-216.
- KINNE, O. 1963. The effects of temperature and salinity on marine and brackish water animals. I. Temperature. *Oceanogr. mar. Biol. Ann. Rev.*, 1: 310-340.
- KINNE, O. 1964. The effects of temperature and salinity on marine and brackish water animals. II. Salinity and temperature — salinity combinations. *Oceanogr. mar. Biol., Ann. Rev.*, 2: 281-339
- KINNE, O. 1970. Temperature. In: KINNE, O. ed. *Marine Ecology*. London, Willey-Interscience, v. 1, pt. 1, p. 407-514.
- LISON, L. 1960. *Histochimie et cytochimie animales. Principes et méthodes*. 3ème ed. Paris, Gauthiers Villars. 2 v.
- LISON, L. & PINHEIRO, P. 1960. Apud LISON, L. 1960.
- LOOSANOFF, W.L. & DAVIS, H.C. 1952. Temperature requirements for maturation of gonads of northern oysters. *Biol. Bull. mar. biol. Lab. Woods Hole*, 103: 80-96.
- LUBET, P. 1959. *Recherches sur le cycle de l'émission des gamètes chez les Mytilidés et les Pectinidés*. 162 p. Thèse, Faculté des Sciences, Université de Paris. Paris, Institut Scientifique et Technique des Pêches maritimes.
- LUNETTA, J. E. 1969. Fisiologia da reprodução dos mexilhões (*Mytilus perna* — Mollusca Lamelli-branchial). *Bolm. Fac. Filos. Ciênc. Univ. S. Paulo, Zool. Biol. mar.*, n.s., 26 33-111.
- MANN, R. 1979a. The effect of temperature on growth, physiology and gametogenesis in the Manila clam, *Tapes philippinarum* (Adams e Reeve, 1950). *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 39: 121-133.
- McMANUS, J.F.A. 1946. Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature*, 158: 202.
- McMANUS, J.F.A. & CASON, J.E. 1950. Carbohydrate histochemistry studied by acetylation techniques. I. Periodic acid methods. *J. exp. Med.*, 91: 651-654.
- NARCHI, W. 1974. Aspectos ecológicos e adaptativos de alguns bivalves do litoral paulista. *Papéis Avulsos Zool.*, S. Paulo, 27 (19): 235-262.
- NARCHI, W. 1976. Ciclo anual da gametogênese de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Molusca, Bivalvia). *Bolm. Zool.*, Univ. S. Paulo, 1: 331-350.
- NASCIMENTO, I.A. 1978. *Reprodução da ostra de mangue, Crassostrea rhizophorae (Goulding, 1828): Um subsídio ao cultivo*. São Paulo, Instituto de Biociências. 200 p. Tese (Doutoramento). Dept. de Biologia do Instituto de Biociências da USP.
- NASCIMENTO, I.A. & LUNETTA, J.E. 1978. Ciclo sexual da ostra de mangue e sua importância para o cultivo. *Bol. Fisiol. Animal*, Univ. S. Paulo, 2: 63-98.
- NEWMAN, G.G. 1967. Reproduction of the South African Abalone *Haliotis midae*. *Investl. Rep. Div. Sea Fish. S. Afr.*, 64: 1-23.
- OLIVO, O.; PORTA & BARBIERIS. 1932. Apud VALERI, V. 1954
- ORTON, J.H. 1920. Sea-temperature, breeding and distribution in marine animals. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 12: 339-336.
- PEARSE, A.G.E. 1968. *Histochemistry theoretical and applied*. 3th ed. London, J. & A. Churchill Ltd., 759 p. 2 v.
- PFITZMEYER, H.T. 1965. Annual cycle of gametogenesis of the soft-shelled clam, *Mya arenaria* at Solomons, Maryland. *Ches. Sci.*, 6 (1): 52-59.

- POPHAM, J.D. 1975. The fine structure of the oocyte of *Bankia australis* (Teredinidae, Bivalvia) before and after fertilization. *Cell Tiss. Res.*, 157: 521-534.
- REAY, P.J. 1979. *Aquaculture*. Southerompton, Camelot Press Ltd. (Serie Studies in Biology n.º 106)
- SASTRY, A.N. & BLAKE, N.J. 1971. Regulation of gonad development in the scallop. *Aequipecten irradians* (L) *Biol. Bull. mar. biol. Lab. Woods Hole*, 140: 274-283.
- SCHMEKEL, L. & FIORONI, P. 1975. Cell differentiation during early development of *Nassarius reticulatus* L (Gastropoda Prosobranchia). I. Zygote to 16-cell stage. *Cell Tiss. Res.* 159: 503-522
- SELMAN, K. & ARNOLD, J.M. 1977. An ultrastructural and cytochemical analysis of oogenesis in the squid *Loligo pealei*. *J. Morph.* 152 (3): 381-400.
- SPICER, S.S. & LILLIE, R.D. 1959. Saponification as a mean of selectively reversing to methylation blockage of tissue basophilia. *J. Histoch. Cytochem.*, 7: 123-125.
- TOENNIES, G. 1942. The oxidative conversion of casein into protein free of methionine and tryptophane. *J. Biol. Chem.*, 145: 667-670.
- VIALLI, M. 1955. Tecnica per l'uso contemporáneo in istochimica dell 'Alcian blue e della reazione di Hotckiss. *Arch. Zool. Ital.*, 40: 399-407.
- WALNE, P.R. 1970. The seasonal variation of meat and glicogen content of seven populations of oysters *Ostrea edulis* L., and a review of the literature. *Fishery Invest.*, Lond., Ser. 2, 26 (3): 1-29.
- WILSON, B.R. 1969. Survival and reproduction of the mussel *Xenostrobus securis* (L) (Mollusca; Bivalvia: Mytilidae) in a Western Australian estuary. Part II: Reproduction, growth and longevity. *J. nat. Hist.*, 3: 93-120.
- WILSON, B.R. & HODGKIN, E.P. 1967. A comparative account of the reproductive cycles of five species of marine mussels (Bivalvia: Mytilidae) in the vicinity of Fremantle Western Australia. *Austr. J. mar. Freshwat. Res.* 18: 175-203.
- WILSON, J.H. & SEED, R. 1974. Reproduction in *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Bivalvia) in Carlingford Lough, Nortern Ireland. *Irish Fish. Invest.* 15 (B): 3-30

Marinei Grotta
Departamento de Morfologia – CCS
Campus Universitário
58.000 – João Pessoa – Paraíba

João Edmundo Lunetta
Departamento de Fisiologia Geral
Instituto de Biociências U.S.P.
Caixa Postal 11.230
05508 – São Paulo – SP