ANDRÉ CARRARA MORANDINI

**Gametogênese e desenvolvimento
embrionário de *Nausithoe aurea* (Scyphozoa,
Coronatae) do Canal de São Sebastião - SP**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
como parte dos requisitos necessários para a
obtenção de Título de *Mestre em Ciências*,
na *Área de Zoologia*.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Lang da Silveira

São Paulo
1999

Morandini, André Carrara

Gametogênese e desenvolvimento
embrionário de *Nausithoe aurea* (Scyphozoa,
Coronatae) do Canal de São Sebastião - SP
136 páginas - 1999

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Zoologia.

1. Scyphozoa 2. *Nausithoe* 3. Coronatae
I. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Zoologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Fábio Lang da Silveira

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fábio Lang da Silveira pela orientação, auxílio, amizade e compreensão durante o decorrer do trabalho.

À FAPESP pela concessão de bolsa de Mestrado (97/03325-3) e reserva técnica (97/08137-0).

À chefe do Departamento de Zoologia (IB-USP), Profa. Dra. Elizabeth Höfling por permitir o uso das instalações para o desenvolvimento do trabalho.

À CAPES pelos auxílios institucionais (respectivamente PROAP/97 e 98) para a manutenção dos Laboratórios de Histologia e Fotográfico no Departamento de Zoologia.

Ao Diretor do Centro de Biologia Marinha da USP (CEBIMar-USP) Prof. Dr. José Carlos de Freitas por permitir o uso das instalações da Instituição para o desenvolvimento do projeto.

À Profa. Dra. Erika Schlenz, coordenadora da Pós-graduação em Zoologia.

Ao Profs. Drs. Sérgio L.S. Bueno (IB-USP) e Alvaro E. Migotto (CEBIMar-USP) pelas inúmeras sugestões e auxílios prestados, respectivamente na histologia e cultivo dos materiais. À Bióloga Luciana P. Andrade pela ajuda no cultivo dos materiais no CEBIMar. Ao técnico do Departamento de Zoologia Enio Matos pelas sugestões na histologia.

Ao Dr. Paul F.S. Cornelius (Natural History Museum London) pela bibliografia não disponível no Brasil.

Ao Sr. George R.C. Monteiro pela paciência na elaboração dos desenhos.

A todos os colegas (Tim, Fábio, Luciana, Helena, Lincoln, Vanessa, Suzana, Alberto, Valquiria, Leila, Emerson, Joacir, Rosana, Cláudio, Valéria, Gisele, Flávio, Paulinho, Fábio, Fernando, André, etc.) do IB-USP e CEBIMar-USP pelo apoio.

Em especial à minha família [Jussara, Dirceu, Rochely, Clézio, Francisco, Malvina, Concheta (†), Heitor, Rita, Enzo, Bianca, Thiele, Carina, Michel] pela compreensão e incentivo constantes.

RESUMO

Nausithoe aurea Silveira & Morandini, 1997 é uma espécie metagenética e dióica com fecundação externa. Os oócitos são liberados continuamente (55 dias em laboratório), porém com grandes variações no número a cada dia. No desenvolvimento embrionário a clivagem, após o estágio de 8 células, passa de holoblástica e igual para pseudoespiral. A gastrulação ocorre por ingressão multipolar e inicia-se aproximadamente 24 horas após a fecundação. A estrutura histológica geral das gônadas assemelha-se a outros Scyphozoa, onde os gonócitos proliferam a partir da gastroderme, migram e diferenciam-se na mesogléia. Na gônada masculina as células germinativas formam camadas razoavelmente distintas e constituem folículos testiculares. Na gônada feminina os oócitos surgem da zona germinativa na gastroderme e apresentam um gradiente de maturação a partir deste ponto (cortes no sentido oral-aboral). Os oócitos encontram-se livres na mesogléia da gônada, sem associação com outras células. A relação espacial entre a musculatura circular, as gônadas e o sulco coronal, é uma característica a ser usada na sistemática do gênero *Nausithoe* Kölliker, 1853.

ABSTRACT

Nausithoe aurea Silveira & Morandini, 1997 is a metagenetic and dioecious species with external fertilization. The oocytes are released continuously (55 days in laboratory), but with great variations in the daily number. In the embryonic development the cleavage, after the 8 cells stage, changes from holoblastic and adequal to pseudospiral. The gastrulation occurs through multipolar ingression and begin 24 hours after fertilization. The general histological structure of the gonads resembles other Scyphozoa, in which the gonocytes proliferate from the gastrodermis, migrate and differentiate in the mesoglea. In the male gonad the germ cells are arranged in distinctive layers and form follicles (cysts). In the female gonad the oocytes develop from the germinative zone in the gastrodermis and present a maturing gradient from this point on (oral-aboral sections). The oocytes are free in the gonad mesoglea, without association to any cell. The spatial relation of the coronal musculature, gonads and coronal groove, is a character to be used in the systematics of the genus *Nausithoe* Klliker, 1853.

ÍNDICE

I - INTRODUÇÃO	1
1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE CNIDARIA, SCYPHOZOA E CORONATAE	2
1.2 REPRODUÇÃO EM SCYPHOZOA E CORONATAE: REVISÃO COM ÊNFASE NAS APLICAÇÕES HISTÓRICAS SISTEMÁTICAS	7
1.3 HISTÓRICO SOBRE OS ESTUDOS HISTOLÓGICOS EM CORONATAE	16
1.4 HISTÓRICO DOS ESTUDOS SOBRE CORONATAE NO BRASIL	18
II - OBJETIVOS	20
III - MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 MATERIAL	23
3.2 COLETA	26
3.3 CULTIVO	26
3.3.1 <u>Cifístomas</u>	27
3.3.2 <u>Éfiras, medusas, embriões e planulóides</u>	28
3.4 FIXAÇÃO DOS MATERIAIS	30
3.5 HISTOLOGIA	30
3.5.1 <u>Refixação em SUSA</u>	30
3.5.2 <u>Preparação para a histologia</u>	31
3.5.3 <u>Preparação dos cortes histológicos</u>	31
3.5.4 <u>Preparação dos corantes</u>	32
3.5.5 <u>Coloração e montagem das lâminas</u>	33
3.6 LÂMINAS TOTAIS E PERMANENTES	34
3.7 DOCUMENTAÇÃO E MEDIÇÕES	35
IV - RESULTADOS	36
4.1 CULTIVO	37
4.1.1 <u>Criação e dados morfológicos</u>	37
4.1.2 <u>Liberação dos oócitos</u>	52
4.1.3 <u>Desenvolvimento embrionário</u>	59
4.2 HISTOLOGIA	69
4.2.1 <u>Estrutura geral da gônada</u>	69
4.2.2 <u>Espermatogênese</u>	72
4.2.3 <u>Oogênese</u>	78
4.2.4 <u>Desenvolvimento embrionário e gastrulação</u>	86
V - DISCUSSÃO	89
5.1 CULTIVO	90
5.1.1 <u>Criação e dados morfológicos</u>	90
5.1.2 <u>Liberação dos oócitos</u>	93
5.1.3 <u>Desenvolvimento embrionário</u>	95
5.2 HISTOLOGIA	99
5.2.1 <u>Estrutura geral da gônada</u>	102
5.2.2 <u>Espermatogênese</u>	104
5.2.3 <u>Oogênese</u>	106
5.2.4 <u>Desenvolvimento embrionário e gastrulação</u>	107
VI - CONCLUSÕES	109
VII - CONSIDERAÇÕES FINAIS	112
VIII - GLOSSÁRIO	114
IX - REFERÊNCIAS	118
X - APÊNDICE	131

I

INTRODUÇÃO

I - INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE CNIDARIA, SCYPHOZOA E CORONATAE

Filo Cnidaria Hatschek, 1888

Os cnidários podem ser animais sésseis (*pólipos*) ou livre-natantes (*medusas*), apresentando em geral simetria radial (com alguns casos de simetria birradial e radio-bilateral). São diploblásticos, isto é, apresentam dois epitélios (*epiderme* e *gastroderme*) e uma camada intermediária mais ou menos desenvolvida (*mesogléia*). A gastroderme delimita a única cavidade corpórea (*cavidade gastrovascular*) cuja única abertura é a boca. Possuem, tipicamente, células denominadas cnidócitos que secretam uma estrutura característica que pode ser urticante: a *cnida* (nematocistos, espirocistos ou pticocistos). Apresentam uma larva ciliada denominada *plânula*. O ciclo de vida dos cnidários pode apresentar apenas uma das formas básicas (pólipo x medusa), ou apresentar ambas (metagênese ou alternância de gerações), apenas variando o grau de dominância de uma das formas. O filo apresenta aproximadamente 11.000 espécies e é atualmente dividido em 4 Classes (ocorrendo discordância entre diferentes autores): Anthozoa Ehrenberg, 1834, Cubozoa Werner, 1975, Hydrozoa Huxley, 1856 e Scyphozoa Goette, 1887 (Hyman, 1940; Meglitsch & Schram, 1991; Bouillon, 1993; Ruppert & Barnes, 1994).

Classe Scyphozoa Goette, 1887

A classe Scyphozoa caracteristicamente apresenta um ciclo de vida metagenético, onde a fase de medusa é mais conspícua que a fase polipóide. As medusas Scyphozoa apresentam órgãos sensoriais marginais (*ropálios*) e filamentos gástricos no estômago. Os pólipos (*cifistomas*) são em geral de pequeno porte (alguns milímetros de altura) e podem se reproduzir assexuadamente originando outros pólipos (brotamento, formação de cistos, planulóides, etc.) ou formar uma ou várias medusas através de fissões transversais (*estrobilização*); após estas fissões o cifístoma regenera e pode em uma outra estação/período, produzir novos brotos, cistos ou medusas (Hyman, 1940; Russell, 1970; Werner, 1984).

O conhecimento do ciclo de vida completo de uma espécie pode facilitar ou em alguns casos resolver problemas sistemáticos, desta forma os estudos de ciclo de vida estão tornando-se cada vez mais comuns e importantes dentro de Scyphozoa e têm sido desenvolvidos em todos os grupos, alguns exemplos são em: Stauromedusae (Kikinger & Salvini-Plawen, 1995); Semaestomeae (Littleford, 1939); Rhizostomeae (Gohar & Eisawy, 1960; Kikinger, 1992); e Coronatae (Werner, 1973; Silveira & Morandini, 1997).

Ordem Coronatae Vanhöffen, 1892

As principais características dos membros da Ordem Coronatae Vanhöffen, 1892, que os distinguem das demais ordens do grupo são: a presença nas medusas de um sulco (*sulco coronal*) separando a exumbrela em duas regiões (disco central x periferia com espessamentos de mesoglêia = pedálios); tentáculos marginais sólidos e não contráteis; estômago preso à subumbrela por 4 septos inter-radiais; presença de septos radiais na cavidade gastrovascular. Os pedálios de Coronate não são homólogos aos pedálios de Cubozoa, sendo em Coronatae espessamentos radiais da mesoglêia na região periférica da exumbrela (entre o sulco coronal e a base dos lóbulos marginais). Uma das características mais distintivas é a ocorrência, na fase polipóide, de um tubo peridérmico bastante desenvolvido envolvendo o corpo do cifístoma (Mayer, 1910; Kramp, 1961; Russell, 1970; Jarms, 1991). Os Coronatae são compostos por cerca de 40 espécies distribuídas em 6 famílias (ver Tabela I).

Tabela I. Lista dos gêneros atuais de Coronatae distribuídos nas respectivas famílias, compilado de diversas fontes (Haeckel, 1880; Bigelow, 1909; Mayer, 1910; Kramp, 1961; Russell, 1970, Cornelius, 1997; Jarms, 1997).

Ordem	Família	Gênero
Coronatae Vanhöffen, 1892	Atollidae Bigelow, 1909	<i>Atolla</i> Haeckel, 1880
	Atorellidae Vanhöffen, 1902	<i>Atorella</i> Vanhöffen, 1902
	Linuchidae Haeckel, 1880	<i>Linuche</i> Eschscholtz, 1829
	Nausithoidae Claus 1879	<i>Nausithoe</i> Kolliker, 1853
		<i>Palephyra</i> Haeckel, 1880
	Paraphyllinidae Maas, 1903	<i>Paraphyllina</i> Maas, 1903
		<i>Nauphanthopsis</i> Fewkes, 1885
	Periphyllidae Haeckel, 1877	<i>Pericolpa</i> Haeckel, 1880
		<i>Periphylla</i> Steenstrup, 1837
		<i>Periphyllopsis</i> Vanhöffen, 1900
		<i>Thecoscyphus</i> Werner, 1984
	<i>Incertae sedis</i>	<i>Stephanoscyphistoma</i> Jarms, 1990

Observação: Nenhuma revisão sistemática sobre o grupo foi realizada até o momento, desta forma algumas das autorias ao nível das famílias podem estar equivocadas; esta tabela é uma tentativa de organizar os dados sobre Coronatae.

Allman (1874) descreveu um pólipo, denominado *Stephanoscyphus mirabilis*, como pertencente a uma nova ordem de Hydrozoa, os Thecomedusae. Posteriormente Metschnikoff (1886) sugeriu uma ligação entre medusas de Coronatae e pólipos da espécie *Spongicola fistularis* Schulze, 1877 (= *Stephanoscyphus mirabilis* Allman, 1874) ao estudar a embriologia de *Nausithoe marginata* Kolliker, 1853. Mas foi no trabalho de Lo Bianco & Mayer (1890) onde foi confirmada a relação de medusas

do gênero *Nausithoe* Klliker, 1853 com plipos do gnero *Stephanoscyphus* Allman, 1874.

Komai (1935) apresenta em seu trabalho uma reviso histrica sobre o conhecimento acerca dos plipos do gnero *Stephanoscyphus*, e sua relao com medusas do gnero *Nausithoe*. Este trabalho o primeiro a analisar detalhadamente a estrutura interna do cifstoma de Coronatae.

Kramp (1959) em seu estudo sobre as espcies solitrias de *Stephanoscyphus*, sinonimiza vrias delas (restando apenas *Stephanoscyphus corniformis* e *Stephanoscyphus simplex*) e apresenta dados para separar estas espcies vlidas, baseando-se em caractersticas do tubo peridrmico. Kramp (1962) apenas adiciona mais dados sobre *Stephanoscyphus corniformis*.

Jarms (1991) apresenta dados que reforam a possibilidade da utilizao de caractersticas dos plipos para a separao das espcies (primeiramente sugerido por Kramp, 1959), mas tambm apresenta chaves de identificao para a famlia Nausithoidae baseadas em caractersticas dos plipos e das medusas.

Bumann & Jarms (1997) investigaram o local das atividades digestivas em duas espcies de Coronatae [*Nausithoe planulophora* (Werner, 1971) e *Thecoscyphus zibrowii* Werner, 1984] utilizando presas tratadas com marcadores fluorescentes. Concluram que a presena ou

ausência das séries internas de espinhos peridérmicos pode influir na localização da digestão na coluna do cifístoma.

Jarms (1997) apresenta a mais completa revisão histórica acerca dos cifístomas de Coronatae. O autor também descreve o pólipo de *Nausithoe globifera* Broch, 1914, e apresenta dados sobre observações onde diferentes espécies apresentam estratégias semelhantes de abreviação do ciclo de vida frente a condições desfavoráveis (salinidade, temperatura, disponibilidade de alimento).

Jarms *et al.* (1999) demonstram que o ciclo de vida de *Periphylla periphylla* (Péron & Lesueur, 1809) é holopelágico, com desenvolvimento direto do ovo fecundado até o estágio de medusa, sem o estágio de plânula, éfira e pólipos.

1.2 REPRODUÇÃO EM SCYPHOZOA E CORONATAE: REVISÃO COM ÊNFASE NAS APLICAÇÕES HISTÓRICAS SISTEMÁTICAS

Scyphozoa

A reprodução sexuada no grupo dos Scyphozoa ocorre de diversas maneiras. Pode ser com a liberação dos gametas na água do mar (fecundação externa), ou ocorrer fecundação nos braços orais ou interna (na cavidade gastrovascular, ou na gônada feminina) (Widersten, 1965); e ainda pode existir a transferência de pacotes de espermatozóides

(“*spermatozeugmata*”) do macho para a fêmea, como ocorre em Cubozoa (Werner, 1984).

Berrill (1949), utilizando dados da literatura, faz uma análise geral acerca do desenvolvimento das cifomedusas. O autor apresenta dados onde demonstra a relação do diâmetro dos oócitos com o tipo de gastrulação sofrida durante o desenvolvimento embrionário. O autor sugere que em espécies que apresentam ovos de diâmetro grande, seus embriões sofram gastrulação por invaginação, e em espécies com ovos pequenos por ingressão e espécies com ovos de tamanho intermediário sofram uma mescla dos dois processos.

O trabalho de Widersten (1965) apresenta dados de algumas espécies de Semaestomeae e Rhizostomeae quanto à histologia da gônada e desenvolvimento embrionário, sendo o primeiro e mais completo estudo comparativo em Scyphozoa e serve como referência para a maioria das revisões sobre o grupo.

O trabalho de Mergner (1971) sobre embriologia em Cnidaria apresenta poucas informações sobre o desenvolvimento embrionário de Scyphozoa, sendo que a maior parte dos dados apresentados, inclusive figuras são retirados do trabalho de Conklin (1908) para uma espécie de Coronatae (ver comentários abaixo). O autor resume a embriologia de Scyphozoa dizendo que o grupo apresenta quase que invariavelmente clivagem radial e invaginação da celoblástula, sendo os outros modos de

clivagem e formação das camadas celulares são apenas variações sobre este padrão normal. Afirmar ainda, que o desenvolvimento em Scyphozoa está em um nível de conhecimento primitivo em relação a Hydrozoa.

A revisão de Campbell (1974) sobre a reprodução em Cnidaria é bastante pobre quanto aos dados sobre Scyphozoa, apresentando poucas informações, baseadas apenas no trabalho de Widersten (1965).

A revisão de Beams & Kessel (1983) sobre oogênese em Cnidaria é bastante geral em relação a Scyphozoa e Anthozoa, restringindo os dados apresentados a Hydrozoa, principalmente Trachylina; grupo onde foi realizado um estudo ultraestrutural pelo segundo autor (Kessel, 1968).

Miller (1983) afirma que Scyphozoa e Anthozoa são grupos consideravelmente menos diversos em hábitos reprodutivos e fisiologia que Hydrozoa. Os dados apresentados são bastante gerais e baseados na literatura e os detalhes estão restritos a Hydrozoa. Comenta que em Scyphozoa a origem das gônadas está em células oriundas presumivelmente da gastroderme, porém ressalta que nenhum estudo detalhado foi realizado. O autor relata a ausência de acrossomo no espermatozóide de Cnidaria e comenta esta semelhança com alguns outros grupos (Bryozoa, Urochordata; alguns Vertebrata, Nematoda e Mollusca).

Lesh-Laurie & Suchy (1991) apresentam uma revisão do conhecimento sobre anatomia microscópica de Scyphozoa, sendo a maioria dos dados sobre reprodução apenas compilações de autores antigos.

Avian & Rottini Sandrini (1991) descrevem a oogênese de algumas espécies de Scyphozoa a nível ultraestrutural. O objetivo dos autores era o conhecimento da reprodução das espécies do Mar Mediterrâneo, face à grande proliferação de medusas na região na década de 1980 (revisão em UNEP, 1991).

Fautin (1992) faz uma compilação dos dados sobre diferenciação sexual, concluindo que os membros do filo Cnidaria não apresentam um sistema reprodutivo, bem como características sexuais secundárias e comportamento sexual. A autora afirma que os padrões de sexualidade estão bastante relacionados com o modo de vida, e que a maioria das generalizações sobre o filo podem estar erradas, por estarem baseadas em observações apenas em Hydrozoa.

Shostak (1993) em sua revisão sobre reprodução assexuada em Cnidaria afirma que a reprodução assexuada pode ocorrer em todos os estágios do ciclo de vida e conclui que: (1) as reproduções sexuada e assexuada são adaptações a diferentes circunstâncias; (2) os mecanismos de controle a nível celular são diferentes para ambos os tipos de reprodução; (3) a reprodução sexuada depende de células da linhagem germinativa, enquanto que a reprodução assexuada depende de células somáticas.

Poucos foram os estudos que analisaram a espermatogênese de quaisquer cifozoários. Existem muitos estudos quanto ao processo nos Hydrozoa (revisão em Miller, 1983). Neste trabalho as poucas informações

sobre Scyphozoa são bastante generalizadas e baseadas principalmente no estudo de Widersten (1965). Hinsch (1974) afirma que o espermatozóide de Scyphozoa seria mais semelhante ao espermatozóide de Hydrozoa. Hedwig & Schäfer (1986) realizaram um estudo da ultraestrutura do espermatozóide de Stauromedusae e Discomedusae (Semaestomeae + Rhizostomeae) e compararam com as observações de Afzelius & Franzén (1971) para Coronatae, concluindo que a estrutura do espermatozóide em Coronatae apresenta semelhanças com ambos os grupos (Stauromedusae x Discomedusae). Os autores supõem que Coronatae estaria em uma posição intermediária entre Stauromedusae e Discomedusae, contrariando a hipótese de Werner (1973) de que Coronatae seria o grupo mais basal dentro de Scyphozoa e concordando com Thiel (1966) e Marques (1997). Franzén (1996) apresenta uma revisão das informações sobre os tipos de espermatozóides em Cnidaria, reafirmando a hipótese de esta ser a condição ancestral para Eumetazoa. Também comenta que os espermatozóides de Scyphozoa e Hydrozoa seriam mais afins do que com o de Anthozoa, e que todos os espermatozóides podem ser divididos em 3 regiões funcionais e estruturais: cabeça, porção mediana e cauda.

Eckelbarger (1994) faz uma revisão sobre a estrutura da gônada feminina em Scyphozoa. De acordo com o autor, na gônada das espécies de Coronatae, os oócitos residem na mesogléia durante a vitelogênese e crescem sem a ajuda das células acessórias. Nas espécies de

Semaeostomeae e Rhizostomeae, os oócitos aparentemente recebem suporte nutricional das células gastrodérmicas modificadas (trofócitos), que assemelham-se ao trofonema dos Anthozoa (Fautin & Mariscal, 1991). Os trofócitos foram denominados células subsidiárias ("*nurse cells*") por Widersten (1965), e corpo paraovular ("*paraovular body*") por Avian & Rottini Sandrini (1991). O trofonema dos antozoários executa um papel nutritivo durante a vitelogênese canalizando nutrientes da cavidade gastrovascular para o oócito, e um papel similar é hipotetizado para os trofócitos de medusas de Semaeostomeae e Rhizostomeae (Eckelbarger & Larson, 1988, 1992). Em Stauromedusae, células foliculares estão intimamente associadas com os oócitos em desenvolvimento por toda a vitelogênese. De acordo com o autor, algumas características da biologia reprodutiva de cnidários podem ser úteis na decifração de relações filogenéticas entre Hydrozoa, Anthozoa e Scyphozoa. Em Anthozoa e Scyphozoa, a origem gastrodérmica das células germinativas é uma razão que sugere uma íntima relação filogenética entre as duas classes (Thiel, 1966). Isto suporta a teoria de que antozoários e cifozoários são mais intimamente relacionados entre si do que com os hidrozoários (Hyman, 1940). Além disso, a existência de complexos trofócito-oócito nos ovários de Semaeostomeae e Rhizostomeae suporta a hipótese que estas ordens são mais intimamente relacionadas dentro de Scyphozoa, e que Coronatae e Stauromedusae são mais próximas da forma basal de Cnidaria (Hyman,

1940; Thiel, 1966; Marques, 1997). Estas descobertas suportam a eficácia do uso de caracteres de biologia reprodutiva dos organismos para decifrar relações filogenéticas de invertebrados.

A mais completa revisão sobre reprodução em Scyphozoa encontra-se no livro de Arai (1997), no qual um capítulo inteiro é dedicado a este assunto. A revisão da autora é baseada em diversos trabalhos, abrangendo todos os aspectos da reprodução no grupo.

Coronatae

Poucos trabalhos fazem referência às gônadas em Scyphozoa, e menos ainda são os trabalhos em Coronatae. Um exemplo é Russell (1956a) onde o autor utiliza principalmente o formato da gônada (em W) para definir uma nova espécie no gênero *Paraphyllina*. O trabalho também apresenta um corte histológico da gônada, porém nenhuma menção é feita quanto à sua estrutura, apenas comentando que na gônada feminina é possível observar oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento, e que na gônada masculina os espermatozóides desenvolvem-se em folículos testiculares que surgem da parede da gônada.

Russell (1956b) demonstra a validade das espécies *Nausithoe atlantica* Broch, 1914 e *Nausithoe globifera*, e apresenta como caracteres distintivos, entre outros, a morfologia externa das gônadas (porção central

extendendo-se em direção à margem da umbrela ou não) e sua posição em relação ao sulco coronal.

Werner (1970) apresenta alguns dados sobre a ecologia de *Nausithoe racemosa* (Komai, 1936) (= *Stephanoscyphus racemosus*), e lança as idéias e inicia experimentos sobre a colonialidade em Coronatae.

Afzelius & Franzén (1971) analisaram a ultraestrutura do espermatozóide de uma espécie do gênero *Nausithoe* (*Stephanoscyphus* spec. 7) cultivada por Werner. Os autores consideraram o espermatozóide de *Nausithoe* como pertencendo ao tipo "primitivo", pois apresenta uma cabeça curta e cônica, uma região mediana com 4 grandes mitocôndrias e uma longa cauda consistindo de um flagelo (65 µm de comprimento). Não existe nenhum acrossomo evidente. Os autores comentam que existe uma conexão definida entre a estrutura do espermatozóide e a biologia da fertilização: o tipo "primitivo" de espermatozóide ocorreria apenas nas espécies que também retiveram fertilização externa.

Werner (1973) apresenta um resumo dos seus trabalhos com Coronatae e continua a demonstrar, agora com mais dados, a sua idéia de evolução dentro de *Stephanoscyphus* (solitário → colonial). Além disso, o autor elucida por completo o ciclo de vida de *Nausithoe racemosa* apresentando dados sobre a liberação dos gametas, e traça algumas considerações sobre a redução do estágio medusóide em *Stephanoscyphus* e a importância do opérculo dos cifistomas no ciclo de vida. O autor sugere,

baseado em seus estudos anteriores e em outros autores, que a ordem Coronatae seja considerada a ordem basal de Scyphozoa e que o gênero *Stephanoscyphus* seja considerado o elo de ligação entre os Scyphozoa atuais e a ordem fóssil Conulata.

Em Werner (1979) as idéias do autor em relação a evolução da colonialidade em Scyphozoa, são apresentadas com um forte embasamento em dados de laboratório adquiridos em quase 2 décadas de cultivo de pólipos e medusas de Coronatae. São apresentadas, ainda, a maior parte das conclusões sistemáticas (baseadas no ciclo de vida) e alguns dados e suposições sobre a fisiologia (crescimento) e ecologia (dados ambientais) de algumas espécies.

Werner & Hentschel (1983) redescrevem o ciclo de vida de *Nausithoe planulophora*, enfatizando as diferenças em relação às outras espécies de coronados. Baseados em análises histológicas demonstram que a espécie não apresenta células germinativas em nenhuma fase do ciclo de vida e assim sendo é considerada apogâmica. Discutem que esta redução no ciclo de vida seria uma resposta da espécie às condições especiais do ambiente onde vive (cavernas submarinas).

Os comentários de Franc (1993) sobre a reprodução em Coronatae são apenas transcrições dos dados de diferentes autores que foram comentados anteriormente.

Sobre o desenvolvimento embrionário do grupo existem apenas 2 trabalhos: Metschnikoff (1886) sobre *Nausithoe marginata* e Conklin (1908) sobre *Linuche unguiculata* (Swartz, 1788) (= *Linerges mercurius*).

1.3 HISTÓRICO SOBRE OS ESTUDOS HISTOLÓGICOS EM CORONATAE

No passado, a maioria dos trabalhos com medusas era proveniente de coleções feitas a partir de grandes expedições e sua preocupação era meramente sistemática. Nestes trabalhos, os autores muitas vezes descreviam espécies novas, porém não existia uma padronização quanto aos aspectos/caracteres que seriam utilizados nestas descrições, não existindo na maioria destes trabalhos referência alguma à análise histológica destes espécimes. Muitos deles (Repelin, 1965, 1966) tecem comentários referentes às gônadas, porém restringindo-se apenas à sua morfologia e padrão de crescimento, que em muitos casos eram suficientes para a separação das espécies. Entretanto, existem alguns estudos que enfatizam a anatomia microscópica das espécies e utilizam este recurso para complementar as descrições da morfologia externa (Claus, 1883; Maas, 1897; Vanhöffen, 1902).

Poucos são os trabalhos que apresentam algumas informações sobre a histologia da região gonadogênica de medusas de Coronatae, entre eles Haeckel (1881) apresenta dados sobre *Nausithoe challengerii* (Haeckel, 1880) (= *Nauphanta challengerii*); Claus (1883) sobre *Nausithoe punctata*

Kölliker, 1853 (= *Nausithoe albida*); Maas (1897) apresenta uma descrição detalhada de *Periphylla periphylla* e de algumas espécies de *Atolla*; e Vanhöffen (1902) complementa as observações de Maas sobre *Atolla*.

Komai (1935) comenta vários aspectos da histologia do pólipó de *Nausithoe racemosa*. O trabalho relata a existência de células germinativas (oócitos e espermatozoides) desenvolvendo-se nos mesentérios (septos gástricos). Quando ocorre a estrobilização, estas células são incorporadas nas éfiras em formação, porém o desenvolvimento posterior não foi acompanhado. O autor tenta relacionar as medusas encontradas no plâncton da região com o cifístoma encontrado, buscando uma solução para as diferenças entre a existência de células germinativas no estróbilo e a ausência na medusa planctônica. As medusas do plâncton foram identificadas como sendo *Nausithoe punctata*, e também foram analisadas quanto a sua anatomia. O autor comenta sobre a formação da gônada nas medusas, e apesar da descrição confusa, pode-se observar através de suas figuras (Komai, 1935:327 Fig.39 A-D) que a formação da gônada se dá por evaginação do epitélio da cavidade gastrovascular com a formação de um seio genital. O autor também relata a dificuldade na interpretação dos cortes histológicos do pólipó de *Nausithoe racemosa*.

Alguns anos mais tarde, o trabalho de Komai & Tokuoka (1939) complementa as observações sobre a estrobilização de *Nausithoe racemosa*

feitas por Komai (1935), descrevendo em detalhe a histologia do estróbilo, fornecendo o diâmetro dos oócitos (0,4 mm) e de seus núcleos (0,1 mm).

Chapman & Werner (1972) realizaram um estudo histológico de algumas espécies de pólipos de Coronatae com relação à sua estrutura interna, principalmente referente às fibras musculares, e também quanto ao processo de produção e reparação da periderme.

Kawaguti & Yoshimoto (1973) também realizaram um estudo histológico, porém apenas utilizando pólipos da espécie *Nausithoe racemosa*.

Matsuno & Kawaguti (1991) analisaram a ultraestrutura do pólipo e estróbilo de *Atorella japonica* Kawaguti & Matsuno, 1981, com especial ênfase às fibras musculares e nervos.

1.4 HISTÓRICO DOS ESTUDOS SOBRE CORONATAE NO BRASIL

Os estudos intensivos sobre os Coronatae no Brasil são bastante recentes (meados da década de 90) e restringem-se a observações realizadas exclusivamente no Estado de São Paulo. Na verdade representam os primeiros estudos realizados com cifístomas no Brasil.

O primeiro trabalho (Silveira & Morandini, 1996) trata de uma coleção feita a partir de pólipos coletados na região norte do Estado de São Paulo e relata a ocorrência de cifístomas solitários de *Stephanoscyphistoma corniformis* (Komai, 1936) em águas profundas (184-510 m).

Silveira & Morandini (1997) descrevem a espécie *Nausithoe aurea* a partir de cifístomas solitários coletados no litoral de São Sebastião (SP) e cultivados em laboratório. Os autores apresentam informações sobre o ciclo de vida e dados sobre os primeiros estágios do desenvolvimento.

Cifístomas coloniais de *Linuche unguiculata* que ocorrem no Canal de São Sebastião tiveram seu ciclo de vida estudado apresentando mecanismos inéditos de reprodução assexuada (Silveira & Morandini, 1998a) e observações sobre dormência (estágios de quietação) (Silveira & Morandini, 1998b).

II

OBJETIVOS

II - OBJETIVOS

O cnidário utilizado neste estudo é a espécie *Nausithoe aurea* Silveira & Morandini, 1997, pertencente à Família Nausithoidae, Ordem Coronatae, Classe Scyphozoa. As razões para a escolha desta espécie como objeto de estudo foram: relativa abundância na natureza (cifístomas); facilidade de cultivo; e, relativa experiência com o material (vide Silveira & Morandini, 1997). Os objetivos do trabalho estão descritos a seguir:

- a) descrever, ao nível da anatomia microscópica, o desenvolvimento embrionário com ênfase no mecanismo de gastrulação;
- b) esclarecer em que estágio se encontra o gameta feminino no momento da fertilização;
- c) descrever a gametogênese, ao nível de microscopia óptica, e esclarecer a posição relativa das regiões gonadogênicas em relação aos limites das bolsas gástricas;
- d) compreender como um "adulto" pode apresentar um ciclo gametogênico sem a desagregação/reconstituição de suas gônadas, algo muito comum em Cnidaria (Jarms, *com. pes.*);
- e) busca de novas características, de possível utilidade na sistemática da espécie para a complementação de sua descrição (objetivo não proposto inicialmente).

III

MATERIAL E MÉTODOS

III - MATERIAL E MÉTODOS

Elaborou-se um glossário com a terminologia referente ao grupo e empregada neste estudo. O glossário cobre os termos apresentados nos itens Material e Métodos e Resultados, e a primeira vez que é feita referência ao termo este apresenta-se sublinhado (ver Glossário, pág. 114).

3.1 MATERIAL

Os cifístomas de *Nausithoe aurea* apresentam-se como pólipos solitários, mas que algumas vezes crescem próximos uns aos outros, formando agregados no substrato (em geral de natureza calcária: pedaços de corais e conchas). Estes possuem um exoesqueleto quitinoso e fixam-se ao substrato por meio de um disco pedal. O tubo peridérmico que envolve o corpo do cifístoma varia de 1,42 - 8,10 mm de comprimento, e apresenta no seu interior várias séries de espinhos peridérmicos, contendo cada uma delas 16 espinhos; 4 grandes (perradiais), 4 intermediários (inter-radiais) e 8 pequenos (ad-radiais). A espécie é metagenética, com estrobilização do tipo polidisco produzindo muitas éfiras que são liberadas. As éfiras liberadas crescem até medusas maduras. As éfiras não liberadas, retidas no tubo peridérmico transformam-se em planulóides. O mesmo cifístoma pode alternar seu ciclo de vida ora produzindo medusas ora planulóides. As medusas apresentam um sulco coronal (delimita o disco central), pedálios, lóbulos marginais e tentáculos. As medusas possuem um diâmetro do disco

central de 4,8 - 10,5 mm, e apresentam 16 lóbulos, a maioria deles com uma mancha amarela central, 8 tentáculos filiformes sólidos e 8 ropálios, cada um com um estatocisto e um ocelo vermelho. As medusas maduras possuem 8 gônadas ad-radiais marrons, o estômago apresenta 4 bolsas gástricas e pode apresentar até 13 filamentos gástricos, em geral sendo 4 grupos de 3 filamentos (Silveira & Morandini, 1997).

Alguns materiais foram depositados em coleções das seguintes Instituições:

- coleção de invertebrados do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, MZSP 12979 - 2 medusas (macho e fêmea) criadas respectivamente por 77 (19/8-4/11/1997) e 74 (23/8-5/11/1997) dias; MZSP 12980 - cifístoma (Na.3) coletado em 6/8/97 na Ponta do Urubu, Ilhabela, SP a 6m de profundidade, criado de 6/8-4/11/97 dias, coletado por A.C. Morandini;

- coleção de cnidários do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro, MNRJ 3362 - 1 medusa macho criada por 81 dias (15/8-4/11/1997) (apresenta em um octante um lóbulo e ropálio ausentes, e 3 e 2 tentáculos); MNRJ 3363 - 1 medusa macho criada por 59 dias (7/9-4/11/1997) (apresenta gônadas com morfologia diferente - forma de luva de boxe); MNRJ 3364 - 3 medusas macho criadas por 70 dias (26/8-4/11/1997) (uma delas apresenta 7 gônadas, outra apresenta 9 gônadas e a terceira apresenta as gônadas com morfologia diferente - forma triangular);

MNRJ 3365 - cortes histológicos seriados (5µm de espessura) de embriões com 48 horas de vida corados com Hematoxilina de Weigert e Tricrômico de Mallory; MNRJ 3366 - cortes histológicos seriados (5µm de espessura) de embriões com 48 horas de vida corados com Hematoxilina de Weigert e Eosina-Floxina; MNRJ 3367 - cortes histológicos seriados transversais (5µm de espessura) de medusa macho corados com Hematoxilina de Mayer-Bennet e Eosina-Floxina; MNRJ 3368 - cortes histológicos seriados transversais (5µm de espessura) de medusa macho corados com Hematoxilina de Mayer-Bennet e Eosina-Floxina; MNRJ 3369 - cortes histológicos seriados longitudinais (5µm de espessura) de medusa macho corados com Hematoxilina de Weigert e Tricrômico de Mallory; MNRJ 3370 - cortes histológicos seriados longitudinais (5µm de espessura) de medusa macho corados com Hematoxilina de Weigert e Tricrômico de Mallory; MNRJ 3371 - cortes histológicos seriados transversais (5µm de espessura) de medusa fêmea corados com Hematoxilina de Mayer-Bennett e Eosina-Floxina; MNRJ 3372 - cortes histológicos seriados transversais (5µm de espessura) de medusa fêmea corados com Hematoxilina de Mayer-Bennett e Eosina-Floxina; MNRJ 3373 - cortes histológicos seriados longitudinais (5µm de espessura) de medusa fêmea corados com Hematoxilina de Weigert e Tricrômico de Mallory; MNRJ 3374 - cortes histológicos seriados longitudinais (5µm de espessura) de medusa fêmea corados com Hematoxilina de Weigert e Tricrômico de Mallory.

3.2 COLETA

Para a obtenção das medusas para o estudo da gametogênese e do desenvolvimento embrionário realizou-se o cultivo dos materiais em laboratório. Como até o presente ainda não foram encontradas, em amostras de plâncton, nenhuma medusa ou éfira de Coronatae (Silveira & Morandini, 1998a; 1998b), optou-se pela coleta dos cifístomas, e a criação das medusas a partir destes em laboratório. Os cifístomas de *Nausithoe aurea* foram coletados no dia 6 de agosto de 1997 na Ponta do Urubu ($45^{\circ}24,77'W$ - $23^{\circ}51,06'S$) (município de Ilhabela, SP) com mergulho autônomo (SCUBA). Os cifístomas encontravam-se crescendo sobre esqueletos mortos do coral *Mussismilia hispida* (Verrill, 1902) (Scleractinia, Mussidae) que foram coletados entre 6 e 7 metros de profundidade. Os corais foram levados ao laboratório do CEBIMar USP e triados sob lupa a fim de encontrar os cifístomas. Estes, quando encontrados, foram retirados do coralo, sempre que possível, com um pedaço de substrato. Após a triagem, os cifístomas foram limpos com auxílio de um pincel e colocados em placas de Petri (diâmetro aproximado de 2 cm) contendo água do mar filtrada.

3.3 CULTIVO

Todas as etapas foram realizadas utilizando as instalações do CEBIMar USP em São Sebastião.

3.3.1 Cifístomas

Os cifístomas de *Nausithoe aurea* foram mantidos nas placas de Petri com água do mar filtrada dentro de câmara de germinação Fanem (mod. CDG 347 adquirida com Auxílio à Pesquisa da FAPESP proc. n° 96/1416-9). A câmara foi regulada para 22°C (+/- 1°C) e com 2h claro/22h escuro. Este período de iluminação foi determinado com base em antigos períodos de criação (1995/1996/1997), tentando minimizar o crescimento de algas na periderme dos cifístomas, o que dificulta a visualização de estruturas e processos de desenvolvimento pelo qual os pólipos passam. Mesmo assim, os cifístomas eram limpos semanalmente com um pincel, pois ainda assim ocorria um pequeno crescimento de algas.

Os cifístomas foram alimentados dia sim, dia não com um macerado de gônada do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1767) (Bivalvia, Mytilidae), preparado pouco antes da ministração do alimento. Os cifístomas eram deixados no alimento por um período de 3-4 horas. Após este período os cifístomas eram transferidos para placas contendo água do mar filtrada. Nos dias em que não era ministrado o alimento, também se procedia a troca da água das placas.

Procedeu-se um acompanhamento diário dos cifístomas a partir do dia da coleta (Ver VI - Resultados - Tabelas III-X).

3.3.2 Éfiras, medusas, embriões e planulóides

Ao estrobilizarem, os cifístomas podem produzir éfiras ou planulóides (Silveira & Morandini, 1997). Quando da produção de éfiras, estas foram separadas do cifístoma parental e mantidas em potes plásticos transparentes (coletores universais marca Zester, capacidade de 200 ml) com água do mar filtrada na mesma câmara em que eram mantidos os cifístomas (22°C, 2h claro/22h escuro).

As éfiras/medusas eram alimentadas diariamente com macerado de gônada do mexilhão *Perna perna*, preparado pouco antes da ministração do alimento. As éfiras/medusas eram colocadas no alimento por aproximadamente 5 minutos ou até terem o estômago preenchido de alimento. Após isso eram transferidas para um pote com água do mar filtrada e eram novamente colocadas na câmara. As éfiras eram mantidas nos potes de acordo com o cifístoma que as deu origem, isto é, cada lote de éfiras estava separado dos demais.

Os planulóides, quando formados e liberados, eram separados dos cifístomas parentais e colocados em uma placa de Petri com água do mar filtrada. Nesta placa encontravam-se alguns substratos para o possível assentamento dos cifístomas, eram eles: pedaços de substrato natural (coral de *Mussismilia hispida*), pedaços de periderme, e uma lamínula. Os planulóides não eram separados por cifístoma, eram todos colocados na mesma placa, que tinha a água trocada diariamente.

Procedeu-se um acompanhamento diário das éfiras/medusas e planulóides a partir do dia em que foram liberados.

O procedimento para as observações e obtenção de oócitos foi: os oócitos liberados eram separados das medusas fêmeas (entre 8 e 9 h da manhã) pouco antes da alimentação das mesmas. Os oócitos isolados eram contados, medidos e utilizados para a fecundação *in vitro*.

O desenvolvimento embrionário foi realizado *in vitro*. Após a liberação dos oócitos estes eram colocados em um recipiente com 5 medusas macho por um período de 1 hora (este tempo foi estipulado após várias tentativas que mostraram que em um período superior a 1 hora os machos comiam parte dos oócitos). As diferentes fases do desenvolvimento embrionário foram fixadas de acordo com os estágios em que se apresentavam (oócito-2-4-8-16-32-64 células) e em períodos de tempo estipulados (11-24-48 horas).

3.4 FIXAÇÃO DOS MATERIAIS

Os materiais (pólipos, éfiras, medusas, embriões, plânulas e planulóides) foram fixados em solução de formaldeído a 4% em água do mar filtrada, e algumas medusas foram refixadas em Susa (ver item 3.5.1.) para a histologia.

3.5 HISTOLOGIA

Durante a execução das preparações histológicas, vários testes utilizando diferentes colorações foram empregados. Como estes testes não foram utilizados no trabalho, optou-se por descrevê-los separadamente (ver Apêndice).

3.5.1 Refixação em SUSA (adaptado de Pantin, 1948)

Preparação da solução:

- Solução A - 45 g Bicloreto de Mercúrio + 30 g Cloreto de Sódio + 800 ml água do mar.

- Solução B - 20 g Ácido Tricloroacético + 40 g Ácido Acético Glacial + 200 ml Formol (40%).

Misturar A+B (1:1) na hora do uso.

Refixação:

a- lavagem em água destilada;

b- fixação em SUSA (24 h);

c- banhos em água destilada;

- d- desidratação em série ascendente de Etanol até 70%;
- e- lavagem em Lugol (Etanol 70% + Iodo metálico) (elimina excesso de Bicloreto de Mercúrio);
- f- desidratação até Etanol 100%.

3.5.2 Preparação para a histologia (adaptado de Mahoney, 1973)

Os materiais (medusas macho, fêmea e embriões) que apresentavam-se fixados em solução de formaldeído a 4% em água do mar, foram preparados para histologia da seguinte maneira:

- a- lavagem em água destilada;
- b- desidratação em série ascendente de Etanol;
- c- diafanização em Xilol + Etanol 100% (1:1);
- d- diafanização em Xilol;
- e- infiltração em Paraplast;
- f- inclusão em Paraplast.

Para os materiais (medusas macho e fêmea) refixados em Susa e tratados como em 3.5.1, iniciava-se o processo a partir do ponto "c" acima.

3.5.3 Preparação dos cortes histológicos (adaptado de Mahoney, 1973)

Após a inclusão, os materiais foram cortados em micrótomo rotativo manual (Leica RM2025). Cada corte apresentava 5 µm de espessura. Estes foram colocados em lâminas de vidro previamente albuminadas com Albumina de Mayer (Behmer, Tolosa & Freitas Neto, 1976). Algumas gotas de água destilada eram colocadas sobre a lâmina e esta era colocada

sobre uma chapa quente (temperatura de $\pm 50^{\circ}\text{C}$) para que os cortes se distendessem. Após os cortes estarem distendidos (aproximadamente 5 min.) as lâminas eram colocadas em estufa (temperatura de $\pm 56^{\circ}\text{C}$) por 20 minutos, para que o excesso de Paraplast escorresse e o corte ficasse firmemente aderido à lâmina.

3.5.4 Preparação dos corantes (segundo Behmer, Tolosa & Freitas Neto, 1976)

- Eosina-Floxina (Lightner, 1996)

- Eosina (estoque) = eosina amarela solução aquosa 1%
- Floxina (estoque) = floxina solução aquosa 1%

Solução de trabalho = 100 ml de Eosina + 10 ml de Floxina + 780 ml de etanol 95% + 4 ml de ácido acético glacial.

- Hematoxilina de Harris (filtrar antes do uso)

- Hematoxilina cristalizada (5 g) + Etanol 95% (100 ml) + Sulfato de Alumínio e Amônio (20 g) + Água destilada (1000 ml) + Ácido acético (2-4 ml) + Óxido de Mercúrio - vermelho - (3 g).

- Hematoxilina de Weigert

- Solução A - 1 g de Hematoxilina + 100 ml de etanol 95%.

- Solução B - 1000 ml de água destilada + 40 ml de Cloreto de Ferro a 30% (24 g) + 10 ml de Ácido clorídrico.

- Misturar as soluções A e B (1:1) na hora do uso.

- Tricrômico de Mallory

- Solução A – Fucsina ácida (solução aquosa 0,5%) (0,5 g + 100 ml de água destilada).

- Solução B – Azul de anilina (0,5 g) + Laranja G (2 g) + Ácido fosfotúngstico (1 g) + 100 ml de água destilada.

3.5.5 Coloração e montagem das lâminas

Para a coloração dos cortes, as lâminas foram tratadas como segue:

1 - Hematoxilina de Weigert + Tricrômico de Mallory (adaptado de Mahoney, 1973).

- desparafinar em Xilol (3 banhos);

- hidratação em série descendente de etanol;

- coloração em Hematoxilina de Weigert (40 min.);

- azular os cortes em água de torneira (20 min.);

- contra coloração em Tricrômico de Mallory soluções A e B (10 e 20 min.);

- desidratação em série ascendente de Etanol;

- 2 banhos em Xilol;
- montagem da lâmina com Permount.

2 - Hematoxilina-Eosina (adaptado de Behmer; Tolosa & Freitas Neto, 1976).

- desparafinar em Xilol (3 banhos);
- hidratação em série ascendente de etanol;
- coloração com Hematoxilina de Harris (15 min.);
- azular em água de torneira (5 min.);
- diferenciar em Etanol 70% ácido (0,5%) de 20-30 segundos;
- azular em água de torneira (10 min.);
- coloração com Eosina-Floxina (5 min.);
- desidratação em série ascendente de Etanol;
- 2 banhos em Xilol;
- montagem da lâmina com Permount.

3.6 LÂMINAS TOTAIS E PERMANENTES (Mahoney, 1973)

Materiais fixados em formol foram desidratados até etanol 70% e tratados como segue:

- coloração com Paracarmin de Mayer (etanol 70%);
- diferenciação em Ácido Clorídrico 1%;
- desidratação em série ascendente de Etanol;
- diafanização em Xilol;
- montagem em lâmina com Permount.

3.7 DOCUMENTAÇÃO E MEDIÇÕES

As lâminas foram observadas e medidas sob microscópio Wild M20 e foram fotografadas em fotomicroscópio Carl Zeiss Jenaval mf-AKS.

Para a realização das medidas das células foram utilizadas 20 células de cada tipo/estágio. Nas células maiores, a medição foi realizada em “cruz”, isto é, medindo-se o maior e o menor eixo. Para as células masculinas utilizou-se o aumento de 1000 vezes. Nas células femininas o aumento utilizado foi de 400 vezes, e a medição era realizada, para padronização, quando era possível visualizar-se o nucléolo.

As fotografias foram digitalizadas em Scanner HP Scanjet 4C, as legendas e escalas, bem como os tratamentos das imagens foram realizados utilizando-se o programa Corel PhotoPaint (versão 8.0).

IV

RESULTADOS

IV - RESULTADOS

A apresentação dos resultados e a sua discussão será feita em itens isolados referentes a cada uma das etapas do estudo, visando facilitar a compreensão dos resultados.

4.1 CULTIVO

4.1.1 Criação e dados morfológicos

Foram coletados 24 cifístomas (Figura 1), que foram denominados Na.1 - Na.24, cujas medidas morfológicas do tubo peridérmico encontram-se na Tabela II. Estes foram cultivados e acompanhados diariamente de 6/8/ a 5/11/1997 (92 dias), e as observações sobre os cifístomas e seus produtos encontram-se nas Tabelas III a X.

Figura 1. Fotomicrografia de cifístomas de *Nausithoe aurea* presos a substratos calcários (pedaços de coral). Notar a variação do tubo peridérmico que envolve o corpo do pólip.

A estrobilização produziu éfiras ou planulóides. O número de éfiras produzidas pelos cifístomas variou de 9-98, e o número de planulóides produzidos variou de 1-58. O período de estrobilização foi de 2-5 dias (média = 3,83) quando o resultado era a formação de éfiras. Quando a estrobilização resultava em planulóides, esta durava de 3-7 dias (média = 5). O intervalo entre sucessivas estrobilizações produzindo éfiras variou de 17-61 dias (média = 31,125). O intervalo entre estrobilizações sucessivas originando planulóides foi de 15-53 dias (média = 37,4). Isto significa que um mesmo cifístoma só produziu éfiras ou planulóides.

Dos 24 cifístomas coletados, 2 (8,34%) produziram medusas fêmeas e 4 (16,67%) produziram medusas macho; 17 (70,83%) cifístomas liberaram planulóides e 1 (4,16%) não estrobilizou. Considerando-se apenas os cifístomas que produziram medusas, tem-se uma razão sexual de 2:1 (M:F). O número de éfiras/medusas liberadas foi: fêmeas = 132, e machos = 271; em contrapartida, o número de planulóides liberados foi de 295.

Os sexos são separados. O intervalo de tempo entre a liberação das éfiras e o início do surgimento dos rudimentos das gônadas variou de 10-17 dias (média = 14) nas fêmeas e de 12-20 dias (média = 16,375) nos machos; já o período de tempo desde a liberação da éfira até o estágio de medusa adulta (= madura) (quando ocorre a liberação dos gametas, visível apenas nas fêmeas) variou de 26-38 dias (média = 31,5). Ao observar-se as

gônadas das fêmeas sob lupa era possível visualizar oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 2) por meio de diferenças de coloração e tamanho (os maiores e mais escuros estando mais desenvolvidos). Aparentemente a gônada apresenta uma "abertura" que esta voltada para a periferia da medusa (lado dos lóbulos marginais) (Figuras 3-4) (para maiores detalhes ver item 4.2.1).

A partir das observações em materiais vivos notou-se que as gônadas apresentam-se periféricas ao sulco coronal e em alguns casos com o sulco coronal próximo à porção adaxial da gônada. Uma outra característica observada nos materiais é a disposição da musculatura coronal (= circular) e sua posição relativa às gônadas (Figuras 3-4), notando-se que a musculatura apresenta-se mais desenvolvida na região da base dos tentáculos (ver também item 4.2.1).

Figura 2. Fotomicrografia de uma medusa fêmea de *Nausithoe aurea* em vista oral. Notar nas gônadas os oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento (diferenças de coloração). Onde: Go = gônada; O = oócito.

Figura 3. Fotomicrografia de um detalhe de medusa fêmea de *Nausithoe aurea*. Notar: a musculatura, gônadas, e relação espacial destas estruturas com o sulco coronal; notar também a posição da abertura do seio genital. Onde: ASG = abertura do seio genital; FG = filamento gástrico; L = lóbulo marginal; MP = mancha pigmentar; Mu = musculatura; R = ropálio; SC = sulco coronal; T = tentáculo.

1 mm

Figura 4. Esquema de meia medusa fêmea de *Nausithoe aurea*. No esquema estão representadas todas as estruturas das medusas. Notar a musculatura, gônadas, e relação espacial destas estruturas com o sulco coronal; notar também a posição da abertura do seio genital. Onde: ASG = abertura do seio genital; B = boca; FG = filamento gástrico; Go = gônada; L = lóbulo marginal; MP = mancha pigmentar; Mu = musculatura coronal; R = ropálio; SC = sulco coronal; T = tentáculo.

Durante o período de cultivo foram obtidas muitas éfiras e medusas com "malformações", isto é, algumas éfiras eram liberadas e apresentavam alguma deformidade nos lóbulos ou ropálios (por exemplo fusão de lóbulos, ou ropálios não situados na margem), e com o decorrer do desenvolvimento algumas medusas apresentavam fusão de gônadas ou aparecimento de uma gônada a mais, a formação de 2 tentáculos a partir de uma mesma base, e até a não formação do ocelo no ropálio (Figuras 5-6).

Figura 5. Fotomicrografia de meia medusa de *Nausithoe aurea* com octante alterado. Notar: variação no número de tentáculos; modificação de octante com ausência de lóbulo marginal e ropálio. Onde: 2T = 2 tentáculos; 3T = 3 tentáculos; B = boca; Go = gônada; LR- = lóbulo marginal e ropálio ausentes.

Figura 6. Esquema de meia medusa de *Nausithoe aurea*. No esquema estão representadas diversas deformidades em diferentes estruturas da medusa. Notar a ausência, adição e morfologia de gônadas, variação no número de tentáculo, ausência de lóbulo marginal, posição do ocelo no ropálio, em comparação com a Figura 4 que representa um animal sem deformidades. Onde: 2T = 2 tentáculos; 3T = 3 tentáculos; Go- = gônada ausente; Go+ = gônada adicional; LR- = lóbulo marginal e ropálio ausentes; Oc = ocelo em posição diferente no ropálio.

Tabela II. Dados morfológicos e *Formquotient* dos tubos peridérmicos dos cifistomas (*sensu* Jarms, 1990, 1991) de *Nausithoe aurea*; as medidas foram realizadas logo após a coleta utilizando-se um microscópio estereoscópico Wild M5. Legenda: Dbd = diâmetro do disco basal; Db = diâmetro do tubo logo acima do disco basal; Do = diâmetro da abertura do opérculo; Ltot = comprimento total do tubo; nwc – número total de séries de espinhos; nwc_{5mm} = número de séries de espinhos nos 5mm basais; D/L_{tot} = *Formquotient* proporção (Do/Ltot); D/L_{2mm} = proporção a 2mm ($D_{2mm}/2$); D/L_{5mm} = proporção a 5 mm ($D_{5mm}/5$); Ø = medição não realizada.

Cifistoma	Dbd (mm)	Db (mm)	Ltot (mm)	D/L_{2mm}	D/L_{5mm}	Do (mm)	nwc	nwc_{5mm}	D/L_{tot}
Na.1	Ø	0,1428	7,3542	0,1904	0,13804	0,7854	8	7	0,106796117
Na.2	0,3094	0,119	6,9972	0,1904	0,12376	0,714	5	5	0,102040816
Na.3	Ø	0,1428	3,6414	0,238	-	0,595	5	5	0,163398693
Na.4	0,2856	0,1428	4,4744	0,1547	-	0,6188	Ø	Ø	0,138297872
Na.5'1	0,3808	0,1666	4,76	0,2023	-	0,6664	Ø	Ø	0,14
Na.5'2	0,4522	0,1666	2,975	0,1904	-	0,5474	Ø	Ø	0,184
Na.6	Ø	0,119	4,046	0,1785	-	0,4522	Ø	Ø	0,111764706
Na.7	0,2856	0,2142	5,236	0,1904	0,13804	0,8568	4	4	0,163636364
Na.8	0,4284	0,0952	3,9746	0,2023	-	0,5474	4	4	0,137724551
Na.9	Ø	0,1904	5,117	0,2023	0,14756	0,8092	4	4	0,158139535
Na.10	Ø	0,1428	6,426	0,1785	0,13804	0,7378	5	5	0,114814815
Na.11	Ø	0,1428	5,355	0,2023	0,10472	0,6188	Ø	Ø	0,115555556
Na.12	0,3094	0,119	4,522	0,1904	-	0,714	5	5	0,157894737
Na.13	0,4522	0,119	4,284	0,2261	-	0,5236	4	4	0,122222222
Na.14	0,4522	0,119	5,474	0,1666	0,119	0,6188	Ø	Ø	0,113043478
Na.16	0,1904	0,1666	5,9262	0,1666	0,12376	0,8092	6	5	0,136546185
Na.17	Ø	0,1666	3,1892	0,2142	-	0,5236	4	4	0,164179104
Na.18	0,3808	0,1428	6,0928	0,2023	0,10472	0,5236	5	5	0,0859375
Na.19	Ø	0,2142	4,0222	0,238	-	0,7378	Ø	Ø	0,183431953
Na.20	0,4284	0,1666	3,927	0,2499	-	0,714	5	5	0,181818182
Na.21	0,238	0,1666	7,5446	0,2142	0,12376	0,833	6	6	0,110410095
Na.22	0,4998	0,1666	3,1416	0,2142	-	0,5236	3	3	0,166666667
Na.23	-	0,2142	2,4276	0,1785	-	0,4998	Ø	Ø	0,205882353
Na.24	-	0,2618	2,856	0,2975	-	0,5236	4	4	0,183333333

Legenda das Tabelas III-X: a? = planulóides absorvidos pelo tecido do cifistoma ou digeridos ?; C = coleta; e = éfiras; E = estróbilo; m = medusa jovem (com início de formação das gônadas); m* = medusa com gametas visíveis; M = medusa adulta (quando já ocorreu liberação de oócitos); Na.x = número do cifistoma; O = oócito liberado; p = planulóides no interior do tubo; P = planulóides liberados; R = cifistoma regenerado; ⊙ = planulóides no interior do cifistoma; ? = processo ou número duvidoso; -- = nenhuma alteração; † = material fixado.

Observação: Nas Tabelas de III-X estão ausentes as informações referentes ao cifistoma denominado Na.15 que foi perdido no mês de agosto e dessa forma as observações referentes a este mês foram descartadas.

Tabela III. Acompanhamento de cifistomas de *Nausithoe aurea* durante Agosto de 1997.

Data	Na.1	Na.2	Na.3	Na.4	Na.5	Na.6	Na.7	Na.8	Na.9	Na.10	Na.11	Na.12	Data
6.viii.97	C p	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	6.viii.97
7.viii.97	p+5P	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	7.viii.97
8.viii.97													8.viii.97
9.viii.97	p+5P	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	9.viii.97
10.viii.97	p+15P	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	10.viii.97
11.viii.97	p+18P	--	--	--	--	--	--	--	--	E	--	E	11.viii.97
12.viii.97	p+57P	--	--	--	--	--	--	--	--	E	--	E	12.viii.97
13.viii.97	58P	--	--	--	--	--	--	--	--	E	--	E	13.viii.97
14.viii.97	52P	--	--	--	--	--	--	--	--	E	--	E	14.viii.97
15.viii.97	52P	--	--	--	--	--	--	--	--	E	--	13e	15.viii.97
16.viii.97	51P	--	E	E	E	--	--	--	--	E	E	13e	16.viii.97
17.viii.97	51P	--	E	E	E	--	--	--	--	p+4P	E	13e	17.viii.97
18.viii.97	R	--	E	E	2E	--	--	--	--	p+6P	E	12e	18.viii.97
19.viii.97	--	--	11e+E	E	2E	--	--	--	E	p+6P	p	11e	19.viii.97
20.viii.97	--	E	15e+R	E	2E	--	--	--	E	p+5P	p	12e	20.viii.97
21.viii.97	51P	E	15e	E	2E	--	--	--	Ee	p+6P	p	12e	21.viii.97
22.viii.97	51P	E	15e	E	2E	--	--	--	Ee	5P+p	p	12e	22.viii.97
23.viii.97	--	E	14e	p	p	--	--	--	20e	6P+p	p	12e	23.viii.97
24.viii.97	--	p	14e	p	p	--	--	--	25e	6P+p	p	12e	24.viii.97
25.viii.97	--	p	14e	p	p	E	--	--	25e	5P+p	5P+p	11e	25.viii.97
26.viii.97	--	p	14e	p	p	E	--	--	25e	4P+p	12P+R	11e	26.viii.97
27.viii.97	--	p	14e	p	p	E	--	--	25e	p	2P	10e	27.viii.97
28.viii.97	--	p	13e	p	p	E	E	--	24e	p	--	10e	28.viii.97
29.viii.97	--	p	13e	p	2P+p	p	E	--	24e	1P+p	--	9e	29.viii.97
30.viii.97	--	10P+p	13e	3P+p	p	p	E	--	23e	15P+p	--	8e	30.viii.97
31.viii.97	E?	2P+p	13e	R+p	p	p	p	E?	23e	8P+R	--	3m+5e	31.viii.97
Data	Na.1	Na.2	Na.3	Na.4	Na.5	Na.6	Na.7	Na.8	Na.9	Na.10	Na.11	Na.12	Data

Tabela IV. Acompanhamento de cifístomas de *Nausithoe aurea* durante Agosto de 1997.

Data	Na.13	Na.14	Na.16	Na.17	Na.18	Na.19	Na.20	Na.21	Na.22	Na.23	Na.24	Data
6.viii.97	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	6.viii.97
7.viii.97	--	E e ?	--	--	--	--	--	--	--	--	--	7.viii.97
8.viii.97												8.viii.97
9.viii.97	--	E e	--	--	--	--	--	--	--	--	8e	9.viii.97
10.viii.97	--	E + 5e	--	--	--	--	--	--	--	--	8e + 7e	10.viii.97
11.viii.97	--	E + 20e	--	--	--	E	--	--	--	--	R + 15e	11.viii.97
12.viii.97	--	R + 31e	--	--	--	E	--	--	--	--	14e	12.viii.97
13.viii.97	--	31e	--	--	--	E	--	--	--	--	14e	13.viii.97
14.viii.97	--	31e	--	--	--	E	--	--	--	--	14e	14.viii.97
15.viii.97	--	31e	--	--	--	E	--	--	--	--	13e	15.viii.97
16.viii.97	--	30e	--	--	--	E	--	--	--	--	13e	16.viii.97
17.viii.97	--	31e	E?	--	--	E + 7P	--	--	--	--	13e	17.viii.97
18.viii.97	--	31e	E	--	--	7P + p	E	--	--	--	13e	18.viii.97
19.viii.97	--	31e	E	--	--	7P + p	E	--	--	--	12e	19.viii.97
20.viii.97	--	29e	E	--	--	7P + p	E	--	--	--	12e	20.viii.97
21.viii.97	--	28e	E	--	--	6P + p	E	E	--	--	12e	21.viii.97
22.viii.97	--	27e	E	--	--	16P + p	E	E	--	--	12e	22.viii.97
23.viii.97	--	27e	1P + p	--	--	19P + p	E	E	--	--	12e	23.viii.97
24.viii.97	--	27e	2P + p	--	--	16P	E	E	--	--	12e	24.viii.97
25.viii.97	--	27e	1P + p	--	--	R + 12P	2P + p	Ee	--	E	5m + 7e	25.viii.97
26.viii.97	--	27e	p	--	--	--	p	12e	--	E	5m + 7e	26.viii.97
27.viii.97	--	27e	1P	--	--	--	p	44e + Ee	--	E	5m + 7e	27.viii.97
28.viii.97	--	27e	2P + p	--	--	--	p	68e + R	--	E	6m + 6e	28.viii.97
29.viii.97	--	1m + 26e	p	--	--	--	p	68e	--	E	6m + 6e	29.viii.97
30.viii.97	--	1m + 26e	15P + p	--	--	--	p	66e	--	E?	6m + 6e	30.viii.97
31.viii.97	--	4m + 23e	1P + p	--	--	--	p	63e	--	p	8m + 4e	31.viii.97
Data	Na.13	Na.14	Na.16	Na.17	Na.18	Na.19	Na.20	Na.21	Na.22	Na.23	Na.24	Data

Tabela V. Acompanhamento de cifístomas de *Nausithoe aurea* durante Setembro de 1997.

Data	Na.1	Na.2	Na.3	Na.4	Na.5	Na.6	Na.7	Na.8	Na.9	Na.10	Na.11	Na.12	Data
1.ix.97	E	1P + p	13e	3P	R + p + 7P	p	p	E	1m + 22e	R + 1p	--	3m + 5e	1.ix.97
2.ix.97	E	P	13e	p	p	p	p	E	1m + 22e	--	--	3m + 5e	2.ix.97
3.ix.97	E	3P + R	13e + R	R + 2p	8P + 2p	⊙	⊙	p	1m + 22e	--	--	3m + 4e	3.ix.97
4.ix.97	E	--	13e	2P	2p	⊙	⊙	p	1m + 22e	--	--	3m + 4e	4.ix.97
5.ix.97	E	--	13e	--	--	⊙	⊙	p	1m + 22e	--	--	3m + 4e	5.ix.97
6.ix.97	E	--	3m + 9e	--	a?	⊙	⊙	p	1m + 22e	--	--	5m + 2e	6.ix.97
7.ix.97	⊙	--	7m + 3e	--	--	⊙	⊙	p	3m + 20e	--	--	5m + 2e	7.ix.97
8.ix.97	p	--	9m + 1e	--	--	p	p	⊙	4m + 19e	--	--	5m + 2e	8.ix.97
9.ix.97	p	--	10m	--	+ 3 cif	18P + R	p	⊙	22m + 1e	--	--	6m + 1e	9.ix.97
10.ix.97	p	--	10m	--	--	--	p	⊙	22m + 1e	--	--	6m + 1e	10.ix.97
11.ix.97	p	--	10m	--	--	--	2P + ⊙	⊙	22m + 1e	--	--	7m	11.ix.97
12.ix.97	p	--	10m	--	--	--	⊙	⊙	22m + 1e	--	--	7m	12.ix.97
13.ix.97	p	--	10m	--	--	--	R + ⊙	R + ⊙	23m	E	--	E + 7m	13.ix.97
14.ix.97	p	--	10m	--	--	--	⊙	⊙	23m	E	--	E + 7m	14.ix.97
15.ix.97	p	--	10m	--	--	--	⊙	⊙	23m	E	--	E + 7m	15.ix.97
16.ix.97	p	--	10m	--	--	--	⊙	⊙	23m	E	--	E + 7m	16.ix.97
17.ix.97	p	--	10m	--	--	--	⊙	⊙	23m	p	--	12e + E + 7m	17.ix.97
18.ix.97	p	--	10m	--	--	--	⊙	⊙	23m	p	--	R + 21e + 7m	18.ix.97
19.ix.97	2P + p	--	10m	--	--	--	⊙	⊙	23m	p	--	21e + 7m	19.ix.97
20.ix.97	p	--	10m	E	--	--	⊙	⊙	23m	p	--	21e + 7m	20.ix.97
21.ix.97	8P + ⊙	--	10m	E	--	--	⊙	⊙	23m	p	--	21e + 7m	21.ix.97
22.ix.97	⊙	--	10m	E	--	--	⊙	⊙	23m	p	--	21e + 7m	22.ix.97
23.ix.97	24P + R + ⊙	--	10m	E	--	--	2P	⊙	3m* + 20m	p	--	21e + 7m	23.ix.97
24.ix.97	⊙	--	10m	p	--	--	⊙	⊙	10m* + 13m	p	--	21e + 7m	24.ix.97
25.ix.97	2P + ⊙	--	10m	p	--	--	1P + ⊙	⊙	16m* + 7m	p	--	21e + 7m	25.ix.97
26.ix.97	--	--	10m	p	--	--	⊙	⊙	17m* + 6m	p	--	20e + 7m	26.ix.97
27.ix.97	--	E ?	10m	p	--	--	⊙	⊙	20m* + 3m	p	--	20e + 7m	27.ix.97
28.ix.97	--	E ?	10m	p	--	--	a?	a?	20m* + 2m	p	--	10m + 10e + 7m	28.ix.97
29.ix.97	--	E	10m	p	--	--	--	--	20M + 2m*	R + 14P	--	10m + 10e + 7m	29.ix.97
30.ix.97	--	P	10m	p	--	--	--	--	22M	--	--	20m + 7m	30.ix.97
Data	Na.1	Na.2	Na.3	Na.4	Na.5	Na.6	Na.7	Na.8	Na.9	Na.10	Na.11	Na.12	Data

Tabela VI. Acompanhamento de cifístomas de *Nausithoe aurea* durante Setembro de 1997.

Data	Na.13	Na.14	Na.16	Na.17	Na.18	Na.19	Na.20	Na.21	Na.22	Na.23	Na.24	Data
1.ix.97	--	7m + 20e	4P + R	--	--	--	8P + R	62e	--	p	8m + 4e	1.ix.97
2.ix.97	--	7m + 20e	--	--	--	--	--	58e	--	p	8m + 4e	2.ix.97
3.ix.97	--	7m + 20e	--	--	--	--	--	58e	E	p	8m + 3e	3.ix.97
4.ix.97	--	E + 7m + 20e	--	--	E	--	--	58e	E	p	8m + 3e	4.ix.97
5.ix.97	--	E + 7m + 20e	--	--	E	--	--	58e	E	p	8m + 3e	5.ix.97
6.ix.97	--	E + 7m + 20e	--	--	⊙	--	--	55e	E	p	10m + 1e	6.ix.97
7.ix.97	--	9e + 7m + 20e + R	--	--	⊙	--	--	54e	⊙	p	10m	7.ix.97
8.ix.97	E	9e + (25m + 2e)	--	--	p	--	--	54e	p	1P + p	4m* + 6m	8.ix.97
9.ix.97	E	9e + (25m + 2e)	--	--	p	--	E	54e	p	p	5m* + 5m	9.ix.97
10.ix.97	E	9e + (25m + 2e)	--	--	p	--	E	54e	p	1P + p	6m* + 4m	10.ix.97
11.ix.97	Ee	9e + 27m	--	--	p	--	E	10m + 45e	p	p	4M + 2m* + 4m	11.ix.97
12.ix.97	Ep	9e + 27m	--	--	p	--	Ep	10m + 45e	p	p	4M + 6m*	12.ix.97
13.ix.97	p	8e + 27m	--	--	p	--	p	15m + 40e	p	p	E + 9M + 1m*	13.ix.97
14.ix.97	p	8e + 27m	--	--	p	--	p	15m + 40e	p	p	E + 10M	14.ix.97
15.ix.97	p	8e + 27m	--	--	R + ⊙	--	p	15m + 40e	p	p + 1P	E + 10M	15.ix.97
16.ix.97	p	8e + 27m	--	--	4P + ⊙	--	p	15m + 40e	R + ⊙	p + 1P	E + 10M	16.ix.97
17.ix.97	p	8e + 27m	--	--	9P	E	p	15m + 40e	1P	R + ⊙	7e + E + 10M	17.ix.97
18.ix.97	p	8e + 27m	--	--	--	E	p	40m + 15e	--	--	R + 17e + 10M	18.ix.97
19.ix.97	p	8e + 27m	--	--	--	E	p	40m + 15e	--	--	17e + 8M	19.ix.97
20.ix.97	p	8e + 27m	--	--	--	E	p	40m + 15e	3P	⊙	17e + 8M	20.ix.97
21.ix.97	p + 2P	8e + 27m	--	--	--	E	p	40m + 15e	--	--	17e + 8M	21.ix.97
22.ix.97	p	8e + 27m	--	--	--	E	p	40m + 15e	--	a?	17e + 8M	22.ix.97
23.ix.97	2P + p	8m + 27m	--	--	--	E	p	52m + 3e	--	--	17e + 8M	23.ix.97
24.ix.97	2P + p	8m + 27m	--	--	--	p	p	54m + 1e	--	--	17e + 8M	24.ix.97
25.ix.97	p	8m + 27m	--	--	--	p	p	54m + 1e	--	--	17e + 8M	25.ix.97
26.ix.97	p	8m + 27m	--	--	--	p	a?	54m + 1e	--	--	18e + 8M	26.ix.97
27.ix.97	R	8m + 27m	--	--	--	p	R	54m + 1e	--	--	18e + 8M	27.ix.97
28.ix.97	⊙	8m + 27m	--	--	--	p	⊙	55m + 1e	--	--	18m + 8M	28.ix.97
29.ix.97	⊙	8m + 27m	--	--	--	p	⊙	56m	--	--	18m + 8M	29.ix.97
30.ix.97	⊙	8m + 27m	--	--	--	p	⊙	56m	--	--	18m + 8M	30.ix.97
Data	Na.13	Na.14	Na.16	Na.17	Na.18	Na.19	Na.20	Na.21	Na.22	Na.23	Na.24	Data

Tabela VII. Acompanhamento de cifístomas de *Nausithoe aurea* durante Outubro de 1997.

Data	Na.1	Na.2	Na.3	Na.4	Na.5	Na.6	Na.7	Na.8	Na.9	Na.10	Na.11	Na.12	Data
1.x.97	--	p	10m	P	--	--	--	--	22M	--	--	20m+7m	1.x.97
2.x.97	--	p	10m	P	--	--	E	--	22M	--	--	20m+7m	2.x.97
3.x.97	--	p	10m	P	--	--	E	--	22M	--	--	20m+7m	3.x.97
4.x.97	--	p	10m	P	--	--	E	--	22M	--	--	20m+7m	4.x.97
5.x.97	--	p	10m	P	--	--	Ep	--	22M	--	--	20m+7m	5.x.97
6.x.97	--	p	10m	P	--	--	p	--	22M	--	E?	20m+7m	6.x.97
7.x.97	--	p	10m	P	--	E?	p	--	22M	--	E?	20m+7m	7.x.97
8.x.97	--	p	10m	P	--	E	p	--	22M	--	E	20m+7m	8.x.97
9.x.97	--	p	10m	P	E	E	p	--	22M	--	E	E+7m+20m	9.x.97
10.x.97	--	p	10m	P	E	E	p	--	22M	--	?	E+7m+20m	10.x.97
11.x.97	--	p	10m	⊕+R	E	p	p	--	22M	--	?	E+7m+20m	11.x.97
12.x.97	--	1P+R	10m	4P+⊕	Ep	p	p	--	22M	--	?	E+7m+21m	12.x.97
13.x.97	--	6P+⊕	10m	⊕	Ep	p	p	--	22M	--	--	Ee+7m+21m	13.x.97
14.x.97	--	8P+R	10m	⊕	Ep	p	1P+p	--	22M	--	--	13e+7m+21m+E	14.x.97
15.x.97	--	--	10m	⊕	Ep	p	p	--	21M	--	--	16e+R+7m+21m	15.x.97
16.x.97	--	--	10m	⊕	p	p	2P+p	--	21M	--	--	7m+16e+21m	16.x.97
17.x.97	--	--	10m	⊕	p	p	1P+p	--	21M	--	--	7m+15e+21m	17.x.97
18.x.97	--	--	10m	⊕	p	p	p	--	21M	--	--	7m+15e+21m	18.x.97
19.x.97	--	--	10m	⊕	p	p	p	--	21M	--	--	7m+15e+21m	19.x.97
20.x.97	--	--	10m	⊕	p	p	p	--	21M	--	--	7m+15e+21m	20.x.97
21.x.97	--	--	10m	1P+⊕	p	p	2P+p	--	21M	--	--	7m+13e+21m	21.x.97
22.x.97	--	--	10m	⊕	R+p+7P	p	p	--	21M	--	--	7m+13e+21m	22.x.97
23.x.97	--	--	10m	a?	p	p	p	--	E+21M	--	--	7m+12e+21m	23.x.97
24.x.97	--	--	10m	--	1P+p	p	p	--	E+21M	--	--	7m+12e+21m	24.x.97
25.x.97	--	--	10m	--	p	p	p	--	E+21M	--	--	7m+12m+21m	25.x.97
26.x.97	--	--	10m	--	2P+p	p	p	--	E+21M	--	--	7m+12m+21m	26.x.97
27.x.97	E	--	10m	--	3P+R+⊕	1P+R+⊕	p	--	Ee+21M	--	--	7m+21m+12m	27.x.97
28.x.97	E	--	10m	--	5P+⊕	⊕	p	--	41e+E+21M	--	--	7m+21m+12m	28.x.97
29.x.97	E	--	10m	--	⊕	⊕	p	--	R+21M+61e	--	--	7m+21m+12m	29.x.97
30.x.97	Ep	--	10m	--	a?	a?	p	--	21M+57e	--	--	21m+7m+11m	30.x.97
31.x.97	Ep	--	10m	--	--	--	p	E	21M+50e	--	--	21m+7m+11m	31.x.97
Data	Na.1	Na.2	Na.3	Na.4	Na.5	Na.6	Na.7	Na.8	Na.9	Na.10	Na.11	Na.12	Data

Tabela VIII. Acompanhamento de cifístomas de *Nausithoe aurea* durante Outubro de 1997.

Data	Na.13	Na.14	Na.16	Na.17	Na.18	Na.19	Na.20	Na.21	Na.22	Na.23	Na.24	Data
1.x.97	1P+☉	8m+27m	E	--	--	p	☉	56m	--	--	18m+8M	1.x.97
2.x.97	☉	8m+27m	E	--	--	p	a?	56m	--	--	18m+8M	2.x.97
3.x.97	☉	8m+27m	E	--	--	p	--	56m	--	--	18m+8M	3.x.97
4.x.97	a?	8m+27m	Ep	--	--	p	--	E+56m	--	--	E+18m+8M	4.x.97
5.x.97	--	8m+27m	p	--	--	p	--	E+56m	--	--	E+18m+8M	5.x.97
6.x.97	--	8m+27m	p	--	--	16P+R	--	E+56m	--	--	E+18m+8M	6.x.97
7.x.97	--	8m+27m	p	--	--	--	--	E+56m	--	--	7e+E+18m+8M	7.x.97
8.x.97	--	8m+27m	p	--	--	--	--	E+9e+56m	--	--	14e+8M+8m*+10m+R	8.x.97
9.x.97	--	8m+27m	p	--	--	--	--	E+35e+57m	--	--	14e+8M+12m*+6m	9.x.97
10.x.97	--	8m+27m	p	--	--	--	--	E+60e+56m	--	--	14e+8M+4m+14m*	10.x.97
11.x.97	--	8m+27m	p	--	--	--	--	E+75e+56m	--	--	14e+8M+17m*	11.x.97
12.x.97	--	8m+27m	p	--	--	--	--	R+98e+56m	--	--	8M+14e+17M	12.x.97
13.x.97	--	8m+27m	17P+R	--	--	1P	1P	97e+56m	--	--	8M+14e+17M	13.x.97
14.x.97	--	8m+27m	--	--	--	--	--	93e+56m	--	--	8M+14e+17M	14.x.97
15.x.97	--	8m+27m	--	--	--	--	--	56m+30e	--	--	8M+14e+17M	15.x.97
16.x.97	--	8m+27m	--	--	--	--	--	56m+30e	--	--	8M + 14e + 17M	16.x.97
17.x.97	--	8m+27m	--	--	--	--	--	56m+30e	--	--	8M+14e+17M	17.x.97
18.x.97	--	8m+27m	--	--	--	--	--	56m+29e	--	--	8M+14e+17M	18.x.97
19.x.97	--	8m+27m	1P	--	--	--	--	56m+28e	--	--	8M+14e+17M	19.x.97
20.x.97	--	8m+27m	--	--	--	--	--	56m+28e	--	--	8M+14e+17M	20.x.97
21.x.97	--	8m+27m	--	--	--	--	--	56m+28e	--	--	8M+14e+17M	21.x.97
22.x.97	--	8m+27m	--	--	--	--	--	56m+28e	--	--	8M+14e+17M	22.x.97
23.x.97	--	8m+27m	--	--	--	--	--	56m+28e	--	--	8M+14m+17M	23.x.97
24.x.97	--	8m+27m	--	--	--	--	--	56m+28e	--	--	8M+14m+17M	24.x.97
25.x.97	--	8m+27m	--	--	--	--	--	56m+28m	--	--	8M+14m+17M	25.x.97
26.x.97	--	8m+27m	--	--	--	--	--	56m+28m	--	--	8M+14m+17M	26.x.97
27.x.97	--	8m+27m	--	--	--	--	E	56m+28m	--	--	8M+14m+17M	27.x.97
28.x.97	--	8m+27m	--	--	--	--	E	56m+28m	--	--	7M+14m+17M	28.x.97
29.x.97	--	8m+27m	--	--	--	--	E	56m+28m	--	--	7M+14m+17M	29.x.97
30.x.97	--	8m+27m	--	--	--	--	Ep	56m+28m	--	--	7M+14m+17M	30.x.97
31.x.97	--	8m+27m	--	--	--	--	Ep	56m+28m	--	--	7M+17M+14m	31.x.97
Data	Na.13	Na.14	Na.16	Na.17	Na.18	Na.19	Na.20	Na.21	Na.22	Na.23	Na.24	Data

Tabela IX. Acompanhamento de cifístomas de *Nausithoe aurea* durante Novembro de 1997.

Data	Na.1	Na.2	Na.3	Na.4	Na.5	Na.6	Na.7	Na.8	Na.9	Na.10	Na.11	Na.12	Data
1.xi.97	Ep	--	10m	--	--	--	p	E	21M+50e	E	--	7m+21m+11m	1.xi.97
2.xi.97	Ep	--	10m	--	--	--	p	E	21M+48e	E	--	7m+21m+11m	2.xi.97
3.xi.97	Ep	--	10m	--	--	--	p	E	21M+45e	E	--	7m+21m+11m+E	3.xi.97
4.xi.97	†	†	10m+†	†	†	†	†	†	21M+†	†	†	†	4.xi.97
5.xi.97			10m†						21M†				5.xi.97
Data	Na.1	Na.2	Na.3	Na.4	Na.5	Na.6	Na.7	Na.8	Na.9	Na.10	Na.11	Na.12	Data

Tabela X. Acompanhamento de cifístomas de *Nausithoe aurea* durante Novembro de 1997.

Data	Na.13	Na.14	Na.16	Na.17	Na.18	Na.19	Na.20	Na.21	Na.22	Na.23	Na.24	Data
1.xi.97	--	8m+27m	--	--	--	--	Ep	27m+56m	--	--	7M+14m*+17M	1.xi.97
2.xi.97	--	8m+27m	--	--	--	--	Ep	27m+56m	--	--	7M+14m*+17M	2.xi.97
3.xi.97	--	8m+27m	--	--	--	--	Ep	27m+56m	--	--	7M+14M+17M	3.xi.97
4.xi.97	†	8m+†	†	†	†	†	†	†	†	†	7M+14M+17M+†	4.xi.97
5.xi.97		8m†									7M+14M+17M†	5.xi.97
Data	Na.13	Na.14	Na.16	Na.17	Na.18	Na.19	Na.20	Na.21	Na.22	Na.23	Na.24	Data

4.1.2 Liberação dos oócitos

Como observado nas Tabelas III-X as fêmeas maduras liberaram oócitos de 11/09 a 05/11/1997. As Tabelas XI-XIII mostram o número de oócitos liberados por diferentes lotes de medusas mantidas em diferentes potes.

O número de oócitos liberados pelas medusas variou bastante no período de postura (ver Tabelas XI-XIII) de 0-485. O número de oócitos liberados por dia pelas medusas adultas variou de 0-168 (média = 77 oócitos/dia) (Na.24; 8-7 medusas); 0-485 (média = 165 oócitos/dia) (Na.9; 22-21 medusas); 3-318 (média = 140 oócitos/dia) (Na.24'; 17 medusas); 19-108 (média = 58 oócitos/dia) (Na.24"; 14 medusas, dados omitidos das Tabelas XI-XIII e Figuras 7-8 devido ao reduzido número de observações = 4 dias).

As Figuras 7-8 são resultantes das Tabelas XI-XIII e mostram que a produção de oócitos é quase contínua por todo o período, porém apresentando oscilações no número de oócitos liberados. Aos gráficos resultantes foram adicionadas linhas de tendência (função polinomial, ajuste por mínimos quadrados - $y = b + c_1x + c_2x^2 + c_3x^3 + \dots + c_6x^6$, grau utilizado 6) disponíveis nos programas Microsoft® Word e Excel (versão 97).

As análise gráficas iniciais foram discutidas com o Prof. MSc. Jorge Tadashi Hiratuka (IME USP). Foi aconselhado que se retirasse os dados

iniciais referentes às medusas Na.24, pois o número de medusas no pote de cultivo variava bastante no período inicial (apenas o gráfico final é apresentado, onde os dados de Na.24 são plotados a partir de 20/9/1997).

Os gráficos finais foram apresentados ao Prof. Dr. Luiz Menna Barreto (ICB USP), especialista em cronobiologia, para discutir se haveria algum ritmo biológico na liberação dos oócitos. O Dr. Menna Barreto não encontrou nenhum tipo de ritmo nos gráficos obtidos, concluindo: 1) ou o período do ritmo do animal é maior que o período amostrado; 2) ou não existe nenhum ritmo regendo a liberação dos oócitos.

Tabela XI. Quantidade diária de medusas por pote de cultivo, número total e médio de oócitos liberados por dia pelas medusas oriundas do cifístoma Na.24 (estrobilização a partir de 8 até 11/8/97).

Data	total medusas	oócitos produzidos	média
11/9/97	4	1	0,25
12/9/97	4	9	2,25
13/9/97	9	11	1,22
14/9/97	10	13	1,3
15/9/97	10	55	5,5
16/9/97	10	30	3
17/9/97	10	55	5,5
18/9/97	10	48	4,8
19/9/97	8	0	0
20/9/97	8	96	12
21/9/97	8	27	3,37
22/9/97	8	54	6,7
23/9/97	8	158	19,75
24/9/97	8	104	13
25/9/97	8	105	13,12
26/9/97	8	0	0
27/9/97	8	4	0,5
28/9/97	8	162	20,25
29/9/97	8	131	16,37
30/9/97	8	129	16,12
1/10/97	8	117	14,62
2/10/97	8	129	16,12
3/10/97	8	0	0
4/10/97	8	168	21
5/10/97	8	154	19,25
6/10/97	8	147	18,37
7/10/97	8	82	10,25
8/10/97	8	112	14

Data	total medusas	oócitos produzidos	média
9/10/97	8	84	10,5
10/10/97	8	8	1
11/10/97	8	64	8
12/10/97	8	138	17,25
13/10/97	8	108	13,5
14/10/97	8	118	14,75
15/10/97	8	118	14,75
16/10/97	8	114	14,25
17/10/97	8	80	10
18/10/97	8	99	12,3
19/10/97	8	37	4,62
20/10/97	8	66	8,25
21/10/97	8	74	9,25
22/10/97	8	30	3,75
23/10/97	8	77	9,62
24/10/97	8	46	5,75
25/10/97	8	127	15,8
26/10/97	8	98	12,25
27/10/97	8	77	9,62
28/10/97	7	114	16,28
29/10/97	7	88	12,57
30/10/97	7	44	6,28
31/10-1/11/97	7	104	14,85
2/11/97	7	41	5,85
3/11/97	7	54	7,71
4/11/97	7	80	11,42
5/11/97	7	70	10

Tabela XII. Quantidade diária de medusas por pote de cultivo, número total e médio de oócitos liberados por dia pelas medusas oriundas do cifístoma Na.24 (estrobilização a partir de 13 até 18/9/1997). (Nas figuras 7-8 denominado Na.24').

Data	total medusas	oócitos produzidos	média
11/10/97	17	29	1,7
12/10/97	17	75	4,41
13/10/97	17	120	7,05
14/10/97	17	159	9,35
15/10/97	17	45	2,64
16/10/97	17	175	10,29
17/10/97	17	105	6,17
18/10/97	17	138	8,11
19/10/97	17	74	4,35
20/10/97	17	80	4,7
21/10/97	17	85	5
22/10/97	17	99	6,23
23/10/97	17	87	5,11
24/10/97	17	126	7,41
25/10/97	17	197	11,58
26/10/97	17	185	10,88
27/10/97	17	99	5,82
28/10/97	17	219	12,88
29/10/97	17	258	15,17
30/10/97	17	228	13,41
31/10-1/11/97	17	262	15,41
2/11/97	17	3	0,17
3/11/97	17	318	18,7
4/11/97	17	280	16,47
5/11/97	17	147	8,64

Tabela XIII. Quantidade diária de medusas por pote de cultivo, número total e médio de oócitos liberados por dia pelas medusas oriundas do cifístoma Na.9 (estrobilização a partir de 19 até 23/8/1997).

Data	Total medusas	oócitos produzidos	média
27/9/97	20	50	2,5
28/9/97	20	194	9,7
29/9/97	20	159	7,95
30/9/97	22	72	3,27
1/10/97	22	113	5,13
2/10/97	22	149	4,54
3/10/97	22	0	0
4/10/97	22	111	5,04
5/10/97	22	166	11,5
6/10/97	22	144	6,54
7/10/97	22	137	6,22
8/10/97	22	73	3,31
9/10/97	22	158	7,18
10/10/97	22	130	5,9
11/10/97	22	150	6,81
12/10/97	22	58	2,6
13/10/97	22	137	6,22
14/10/97	22	41	1,86
15/10/97	21	140	6,6
16/10/97	21	152	7,23

Data	Total medusas	oócitos produzidos	média
17/10/97	21	152	7,23
18/10/97	21	145	6,9
19/10/97	21	79	3,76
20/10/97	21	142	6,76
21/10/97	21	70	3,33
22/10/97	21	138	6,57
23/10/97	21	84	4
24/10/97	21	143	6,8
25/10/97	21	211	10,04
26/10/97	21	82	3,9
27/10/97	21	129	6,14
28/10/97	21	255	12,14
29/10/97	21	262	12,47
30/10/97	21	337	16,04
31/10-1/11/97	21	456	21,71
2/11/97	21	377	17,95
3/11/97	21	393	18,71
4/11/97	21	485	23,09
5/11/97	21	414	19,71

Figura 7. Número total de oócitos liberados por dia, respectivamente, por 8-7, 17 e 22-21 medusas oriundas de estrobilização dos cifístomas Na.24, Na.24' e Na.9 e linhas de tendência.

Figura 8. Número médio de oócitos liberados por dia pelas medusas e linhas de tendência.

4.1.3 Desenvolvimento embrionário

A fecundação é externa; as fêmeas liberam os oócitos pela boca (Figura 9) e estes ficam agrupados por um cordão mucoso muito transparente.

Figura 9. Fotomicrografia de uma medusa fêmea de *Nausithoe aurea* em vista oral. Notar a liberação dos oócitos pela boca.

Ao serem liberados os oócitos estão envoltos por uma membrana (oolema) e já apresentam 2 corpúsculos polares (Figuras 10-11); em alguns casos foram observados mais que 2 corpúsculos polares. Os oócitos recém liberados apresentam um diâmetro que varia de 132-188 x 164-208 μm (média = 167 x 179 μm). Algumas vezes eram observados espermatozóides movimentando-se no interior do espaço entre o oócito e a membrana oolema.

Figura 10. Fotomicrografia de um oócito recém liberado de *Nausithoe aurea*. Onde: CP = corpúsculos polares; O = oócito; Ool = membrana do ovo (oolema).

Figura 11. Esquema de um oócito recém liberado de *Nausithoe aurea*. Onde: CP = corpúsculos polares; O = oócito; Ool = membrana do ovo (oolema).

A clivagem é holoblástica originando células iguais. O acompanhamento dos oócitos mostrou que após 1 ½ a 2 horas (após a junção com as medusas macho) ocorria a primeira clivagem originando 2 células. Esta divisão ocorria meridionalmente (a partir da região dos corpúsculos polares – pólo animal) formando a princípio uma figura semelhante a um desenho de coração (Figuras 12-15). A passagem de 2 para 4 células ocorreu entre 2 ½ a 3 horas, e esta divisão também foi meridional (Figuras 16-17). O período para a mudança de 4 para 8 células levava de 3 ½ a 4 horas, e ocorria equatorialmente às divisões anteriores (Figura 18). A partir da terceira clivagem esta deixa de ser radial e torna-se pseudoespiral (Figura 19). O desenvolvimento foi acompanhado através das divisões subsequentes, não sendo observada nenhuma modificação externa.

Após 24 horas o embrião começava a girar no interior da membrana do ovo; esta rompeu-se e o embrião movimentou-se (girando) sobre o fundo dos recipientes de cultivo. Nesta fase o embrião apresentava-se arredondado e com uma das extremidades um pouco achatada (Figuras 20-21). Após 48 horas da fecundação o embrião já apresenta movimentos ativos na coluna de água (recipiente de cultivo) e seu formato já é bastante alongado (Figuras 22-23) e com grande semelhança com os planulóides produzidos assexuadamente (Figura 24).

Figura 12. Fotomicrografia do início da primeira clivagem do embrião de *Nausithoe aurea*. Notar: a clivagem inicia-se a partir da região dos corpúsculos polares, formando uma figura semelhante a um coração.

Figura 13. Esquema do início da primeira clivagem do embrião de *Nausithoe aurea*. Notar: a clivagem inicia-se a partir da região dos corpúsculos polares, formando uma figura semelhante a um coração.

Figura 14. Fotomicrografia do embrião de *Nausithoe aurea* com 2 células.

Figura 15. Esquema do embrião de *Nausithoe aurea* com 2 células.

Figura 16. Fotomicrografia do embrião de *Nausithoe aurea*, com 4 célula e em vista polar.

Figura 17. Esquema do embrião de *Nausithoe aurea*, com 4 célula e em vista polar.

Figura 18. Fotomicrografia do embrião de *Nausithoe aurea*, com 8 células e em vista polar. A partir deste estágio a divisão passa a ser pseudoespiral.

Figura 19. Fotomicrografia do embrião de *Nausithoe aurea* com 64 células.

Figura 20. Fotomicrografia do embrião de *Nausithoe aurea*, 24 horas após a fecundação e móvel. A seta indica a direção do movimento. Notar: o embrião já encontra-se livre da oolema; o embrião apresenta-se arredondado e com uma das extremidades um pouco achatada.

Figura 21. Esquema do embrião de *Nausithoe aurea*, 24 horas após a fecundação e móvel. Notar: o embrião já encontra-se livre da oolema; o embrião apresenta-se arredondado e com uma das extremidades um pouco achatada.

Figura 22. Fotomicrografia de um embrião de *Nausithoe aurea*, 48 horas após a fecundação, alongado e móvel. A seta indica a direção do movimento.

Figura 23. Esquema de um embrião de *Nausithoe aurea*, 48 horas após a fecundação, alongado e móvel.

Figura 24. Fotomicrografia de um planulóide de *Nausithoe aurea* produzido assexuadamente. Onde: MB = membrana basal.

4.2 Histologia

Através das preparações histológicas pode-se comprovar que os sexos são separados, não tendo sido encontrado hermafroditismo nas gônadas das medusas analisadas.

4.2.1 Estrutura geral da gônada

A gônada consiste de uma evaginação centrípeta da gastroderme do assoalho da cavidade gastrovascular, que nos cortes no sentido oral-aboral aparece como uma estrutura digitiforme com o interior preenchido por mesogléia (Figuras 25-26) onde desenvolvem-se os folículos testiculares ou os oócitos. Nota-se que existe uma diferença entre as células gastrodérmicas da porção aboral e oral da gônada.

A aparente "abertura" da gônada, observada em materiais vivos não foi observada nos cortes histológicos. A gônada é uma estrutura maciça e esta suposta "abertura", na verdade, trata-se da abertura do seio genital para a cavidade gastrovascular (Figuras 25-26).

Os cortes no sentido oral-aboral confirmam as observações realizadas em materiais vivos. Nestes cortes (Figuras 25-26) é possível notar que o sulco apresenta-se mais próximo à região mediana da gônada (e acredita-se que este seja um efeito do tratamento para a histologia com retração dos tecidos). Nos mesmos cortes (Figuras 25-26) também pode-se visualizar a relação de posição da musculatura com a gônada e com a base

dos tentáculos. Nos cortes no sentido oral-aboral é possível visualizar a musculatura (fibras musculares), que apresentam-se vermelhas quando coradas com a técnica de Hematoxilina de Weigert + Tricrômico de Mallory. Na região da musculatura observa-se um espessamento tanto da epiderme quanto da gastroderme, que inicia-se na porção próxima à "zona germinativa" e termina na base dos tentáculos, o que corresponde com as observações em materiais vivos (Figuras 3-4).

Figura 25. Fotomicrografia de um corte histológico no sentido oral-aboral de uma medusa macho de *Nausithoe aurea*. Notar: as gônadas são evaginações da gastroderme do assoalho da cavidade gastrovascular; o espessamento da parede na região da musculatura coronal; a posição e abertura do seio genital. Onde: B = boca; Es = estômago; FG = filamento gástrico; Go = gônada; Ma = manúbrio; Mu = musculatura; SC = sulco coronal; SG = seio genital.

Figura 26. Esquema de um corte histológico no sentido oral-aboral de uma medusa de *Nausithoe aurea*. Notar: no lado direito é representada uma gônada feminina e no esquerdo uma gônada masculina; as gônadas são evaginações da gastroderme do assoalho da cavidade gastrovascular; o espessamento da parede na região da musculatura coronal; a posição e abertura do seio genital. Onde: B = boca; Es = estômago; FG = filamento gástrico; Go = gônada; Ma = manúbrio; Mu = musculatura; SC = sulco coronal; SG = seio genital.

4.2.2 Espermatogênese

A gônada masculina é composta por vários folículos (Figuras 27-29). O folículo testicular é uma estrutura saliente para dentro da gônada (em cortes transversais). O amadurecimento do folículo (sucessivas divisões mito/meióticas até a formação dos espermatozóides) se dá em direção ao centro (Figura 27 e 29), com as células formando camadas que podem ser razoavelmente visualizadas (definidas) em cortes transversais.

Figura 27. Fotomicrografia de um corte histológico transversal da gônada masculina de medusa de *Nausithoe aurea*. Observar vários folículos salientes para dentro da gônada. Onde: CGV = cavidade gastrovascular; F = folículo; M = mesoglêia.

Figura 28. Esquema de um corte histológico transversal da gônada masculina de medusa de *Nausithoe aurea*. Observar vários folículos salientes para dentro da gônada. Onde: Ec = espermatócito; Eg = espermatogônia; Et = espermatídeo; Ez = espermatozóides; F = folículo; G = gastroderme; M = mesogléia; SG = seio genital.

Figura 29. Esquema de um corte histológico no sentido oral-aboral da gônada masculina de medusa de *Nausithoe aurea*.

As descrições referentes às observações sobre os estágios celulares no interior do folículo são baseadas em cortes transversais, o que determina uma maior área gametogênica na preparação.

As espermatogônias surgem a partir da gastroderme, encontrando-se na margem do folículo (Figuras 27-28 e 30-31), formando uma camada reduzida. São células de contorno esférico apresentando citoplasma reduzido e onde os núcleos apresentam diâmetro variando de 4,8-6,0 μm .

Os espermatócitos aparecem, também, como células esféricas, e com citoplasma bastante reduzido, porém seus núcleos (diâmetro de 4,8-6,6 μm) são mais claros; apresentam cromatina granular espalhada por todo o núcleo. Encontram-se logo após a camada de espermatogônias, tomando-se como ponto inicial a margem do folículo em direção ao centro da gônada (Figuras 27-28 e 30-31).

As espermátides são células esféricas, com citoplasma bastante reduzido, no interior dos núcleos a cromatina está organizada em bloco ou formando grumos grosseiros, geralmente na porção mais central do núcleo, este com diâmetro variando de 2,4-3,6 μm (Figuras 27-28, 30 e 32).

Na espermiogênese (diferenciação das espermátides em espermatozóides) os espermatozóides apresentam a cabeça cônica variando de 4,2-6,0 μm de comprimento, encontrando-se imersos em uma matriz difusa e com os flagelos irradiando a partir deste local para o centro. Abaixo da cabeça ocorre uma estrutura que não adquire coloração, quando

coradas com a técnica HE (possivelmente onde encontram-se as mitocôndrias e chamada "peça intermediária") (Figura 33).

Figura 30. Fotomicrografia de um corte histológico transversal da gônada masculina de uma medusa de *Nausithoe aurea* mostrando detalhe de um folículo. Observar que as células em amadurecimento formam camadas razoavelmente definidas.

Figura 31. Fotomicrografia de um corte histológico transversal da gônada masculina de medusa de *Nausithoe aurea*, mostrando as espermatogônias e os espermatócitos. Onde: Ec = espermatócito; Eg = camada de espermatogônias.

Figura 32. Fotomicrografia de um corte histológico transversal de gônada masculina de *Nausithoe aurea* mostrando as espermatídes. Onde: Et = espermatíde.

Figura 33. Fotomicrografia de um corte histológico transversal de gônada masculina de *Nausithoe aurea* mostrando os espermatozóides. Observar: flagelos (caudas); região logo abaixo da cabeça que não adquire coloração. Onde: Cez = cabeça do espermatozóide; Fl = flagelo.

4.2.3 Oogênese

A gônada feminina apresenta caracteristicamente diferenças entre os dois epitélios gastrodérmicos (aboral e oral, em cortes no sentido oral-aboral). O epitélio oral adquire uma coloração mais intensa independente da técnica de coloração empregada, apresenta células mais arredondadas e que em cortes transversais é mais interno e revestindo o seio genital; geralmente este epitélio apresenta em sua superfície livre (voltada para o seio genital) uma camada que adquire coloração bem fraca (esmaecida) e de contorno muito irregular, que acredita-se seja muco produzido por estas células. O epitélio aboral (ou de revestimento) é mais alto, possui células colunares ou cilíndricas com muitos grânulos e vacúolos, que em geral situam-se na base das células (lado voltado para o interior da gônada) sendo mais externo em cortes transversais (Figuras 34-35). Os oócitos de *Nausithoe aurea* surgem do interior da gastroderme, porém através dos métodos de coloração empregados não foi possível verificar se uma determinada célula sofre algum tipo de modificação, detectável através de suas propriedades tintoriais, para se diferenciar em célula gamética. Os oócitos permanecem isolados na mesogléia, sem manter nenhuma associação com células gastrodérmicas especializadas (subsidiárias ou trofócitos). Nos cortes histológicos das gônadas femininas foram observados oócitos em diferentes estágios de maturação, independentemente da idade da medusa (Figura 36-37). O aparecimento

dos oócitos ocorre a partir da região de contato da gônada com o epitélio do assoalho da cavidade gastrovascular, sendo esta região chamada de zona germinativa (ver V - Discussão, item 5.2.1).

A denominação das células observadas como oócitos (notar que não foi especificada a ordem ou sequência de divisões celulares) está baseada na observação sobre os materiais vivos, nas quais verificou-se que estas células, pouco antes ou logo após a fecundação, liberavam 2 corpúsculos polares (Figuras 10-11).

Figura 34. Fotomicrografia de um corte histológico transversal da gônada feminina de medusa de *Nausithoe aurea*. Onde: CGV = cavidade gastrovascular; M = mesoglêia; O = oócito; SG = seio genital.

Figura 35. Esquema de um corte histológico transversal da gônada feminina de medusa de *Nausithoe aurea*. Onde: M = mesoglêia; O = oócito; SG = seio genital.

Figura 36. Fotomicrografia de um corte histológico no sentido oral-aboral da gônada feminina de medusa de *Nausithoe aurea*. Notar: oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento, e inseridos na mesoglêia da gônada. Onde: CGV = cavidade gastrovascular; M = mesoglêia; Mu = musculatura; O = oócito; S = subumbrela; SG = seio genital; ZG = zona germinativa.

Figura 37. Esquema de um corte histológico no sentido oral-aboral da gônada feminina de medusa de *Nausithoe aurea*. Notar: oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento, e inseridos na mesoglêia da gônada. Onde: ASG = abertura do seio genital; E = epiderme; Ex = exumbrela; CGV = cavidade gastrovascular; G = gastroderme; M = mesoglêia; Mc = muco; Mu = musculatura; O = oócito; S = subumbrela; SG = seio genital; ZG = zona germinativa.

As observações a seguir sobre os diferentes estágios de maturação dos oócitos na gônada feminina restringem-se a observações de lâminas coradas com a técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) e Hematoxilina de Weigert-Tricrômico de Mallory (W+M).

Foram observadas pequenas células esféricas (diâmetro de 16,5-36,0 μm) com citoplasma reduzido basófilo e com núcleos bastante claros (diâmetro de 10,5-22,5 μm), com cromatina esparsa e com o nucléolo visível (diâmetro de 4,5-7,5 μm). Nos cortes no sentido oral-aboral estas células aparecem na zona germinativa (Figura 38), em geral estando no interior da gastroderme ou no início da migração para a mesogléia. Estas células foram consideradas os oócitos basófilos (primários ou iniciais) de pequeno porte (Figura 38).

O oócito basófilo de maior porte, em geral, apresenta-se esférico ou elíptico (diâmetro de 31,5-82,5 μm), com citoplasma basófilo (granulação mais uniforme e um pouco mais escura, amarronzada - HE; coloração avermelhada - W+M), núcleo volumoso claro (diâmetro de 18,0-46,5 μm) e com um nucléolo conspícuo (diâmetro de 6,0-10,5 μm). Estes oócitos já se encontravam imersos na mesogléia (Figuras 39-40).

Oócitos acidófilos são geralmente esféricos (diâmetro de 73,5-133,5 μm) com citoplasma acidófilo (granulação mais evidente e coloração mais avermelhada - HE; coloração azulada - W+M), núcleos claros (diâmetro de 24,0-51,0 μm) com nucléolo (diâmetro de 9,0-12,0 μm) (Figura 39-40).

Figura 38. Fotomicrografia de um corte histológico no sentido oral-aboral da gônada feminina de medusa de *Nausithoe aurea*. Notar: oócito deixando a zona germinativa e penetrando na mesoglêia da gônada. Onde: CGV = cavidade gastrovascular; M = mesoglêia; O = oócito; SG = seio genital; ZG = zona germinativa.

Figura 39. Fotomicrografia de um corte histológico corado com HE no sentido oral-aboral da gônada feminina de medusa de *Nausithoe aurea*. Onde: CGV = cavidade gastrovascular; OA = oócito acidófilo; OB = oócito basófilo; SG = seio genital.

Figura 40. Fotomicrografia de um corte histológico transversal corado com W+M da gônada feminina de medusa de *Nausithoe aurea*. Onde: OA = oócito acidófilo; OB = oócito basófilo.

Em alguns oócitos era possível visualizar pontos mais escuros no interior dos grânulos de vitelo. Esses grânulos lembravam pequenas células e apresentavam-se distribuídos irregularmente pelo citoplasma dos oócitos e em alguns dos oócitos eles não eram observados.

4.2.4. Desenvolvimento embrionário e gastrulação

As observações dos cortes histológicos dos oócitos liberados e das primeiras clivagens não acrescentam nenhuma informação às observações realizadas nos materiais vivos (ver item 4.1.2.).

A análise dos cortes histológicos dos embriões (24, 48 horas após a fecundação) mostrou que o processo de gastrulação acontece por ingressão (imigração) multipolar (Figura 41-42), e deve iniciar-se aproximadamente 24 horas após a fecundação. Nos cortes de embriões de 11 horas não foi observado nenhum núcleo, conseqüentemente célula, em processo de migração. Nenhuma figura de invaginação foi observada em nenhum dos períodos observados; e nenhum agregado de núcleos foi observado formando-se em um dos pólos caracterizando a ingressão unipolar.

Nas observações dos embriões com 48 h após a fecundação não é possível observar a membrana basal (predecessora da camada de mesogléia). Para a observação/comparação da lâmina basal foram utilizadas preparações totais de plânulas de *Lophogorgia punicea* (Milne Edwards & Heime, 1857) (Anthozoa, Gorgonaceae) (Figura 43), e

planulóides de *Nausithoe aurea* (Figura 24) e de uma espécie não identificada de Rhizostomeae.

Figura 41. Fotomicrografia de um corte histológico de um embrião de *Nausithoe aurea* 48 horas após a fecundação. Observar as células em migração oriundas de diferentes regiões do embrião (migração multipolar). Onde: ϕ = células em migração.

Figura 42. Esquema de um corte histológico de um embrião de *Nausithoe aurea* 48 horas após a fecundação. Observar as células em migração oriundas de diferentes regiões do embrião (migração multipolar). Onde: ϕ = células em migração.

Figura 43. Fotomicrografia de plânulas de *Lophogorgia punicea* (Anthozoa, Gorgonaceae). Onde: MB = membrana basal.

V

DISCUSSÃO

V - DISCUSSÃO

5.1 CULTIVO

5.1.1 Criação e dados morfológicos

Os dados morfológicos dos cifístomas de *Nausithoe aurea* mantidos em cultivo (Tabela II) encontram-se dentro dos valores encontrados por Silveira & Morandini (1997) para a mesma espécie, e que são próximos dos valores obtidos por Jarms (1991) para *Nausithoe planulophora* e *Nausithoe maculata*. As características do corpo do pólipó são insuficientes para a separação das espécies. *Nausithoe planulophora* diferencia-se de *Nausithoe aurea* e *Nausithoe maculata* pois apresenta apenas 8 espinhos internos nas séries basais, enquanto que as outras 2 espécies apresentam 16 espinhos em todas as séries. Estes dados refletem a importância dos estudos de ciclo de vida na sistemática de Coronatae.

Segundo Silveira & Morandini (1997) o número de éfiras e de planulóides produzidos respectivamente por cifístomas de *Nausithoe aurea* variou de 10-89 e de 3-29. O período de estrobilização originando éfiras e planulóides variou respectivamente de 2-7 dias e de 1-7. Os autores não fornecem o intervalo entre estrobilizações sucessivas, mas indicam que o tempo para o surgimento dos primórdios gonadais das fêmeas desde a liberação das éfiras variou de 13-23 dias, e a liberação dos gametas ocorre 26-30 dias após a liberação das éfiras. Ao se comparar os dados obtidos com os dados de Silveira & Morandini (1997) observa-se que ocorre

sobreposição de valores e que em alguns casos os extremos são ampliados (p. ex.: número de éfiras produzidas, número de planulóides produzidos). A produção exclusiva de éfiras ou planulóides observada nos cifístomas deste estudo não corrobora as observações de Silveira & Morandini (1997) que comentam que a espécie pode alternar o ciclo de vida produzindo ora éfiras ora planulóides.

Silveira & Morandini (1997) não comentam sobre a razão sexual da espécie. Os dados obtidos neste período de cultivo, sobre a proporção de cifístomas que produziram éfiras/medusas ou planulóides, diferem dos dados apresentados por Silveira & Morandini (1997). Na descrição original a proporção é semelhante, enquanto que neste estudo o número de cifístomas que produziram planulóides é muitas vezes maior que o número de cifístomas que produziram éfiras/medusas, não importando o sexo. Se os resultados deste estudo (elevada proporção de cifístomas produzindo planulóides) refletem o comportamento reprodutivo na espécie no ambiente, tais resultados podem ser uma evidência do predomínio da reprodução assexuada dos coronados na natureza, como proposto por Silveira & Morandini (1998a) para *Linuche unguiculata*.

De acordo com Silveira & Morandini (1997) as medusas de *Nausithoe aurea* apresentam zooxantelas em pequena quantidade; porém nos materiais obtidos não se observou a presença de zooxantelas. Este fato pode ser explicado pelo fotoperíodo de apenas 2h de claro (luz) em que

foram mantidos os animais, o que pode ter causado a regressão das zooxantelas.

As observações acerca da musculatura nos materiais vivos são complementadas pelos dados da histologia no que se refere à posição espacial. O espessamento da musculatura na região da base dos tentáculos pode estar associado com o hábito da espécie em questão permanecer com os tentáculos voltados para cima, comportamento alimentar este comum para a maioria dos Coronatae (Larson, 1979; Wrobel & Mills, 1998) e comum também em Narcomedusae (Hydrozoa) (Larson, Mills & Harbison, 1989).

Nas medusas cultivadas foram observadas "malformações", que acreditávasse serem decorrentes do cultivo, e que no ambiente natural, tais espécimes "irregulares" não ocorreriam. Porém, um dado interessante comentado por Komai (1935) é a existência de espécimes "irregulares" nas medusas encontradas no plâncton da região das proximidades de Seto (Japão) (sendo esta variação em relação ao número e posição de lóbulos, tentáculos, filamentos gástricos e principalmente gônadas).

A inexistência de dados na bibliografia comparando informações da anatomia microscópica (gametogênese) com dados da biologia reprodutiva das espécies, mostra o quão escasso é o nosso conhecimento sobre a biologia desses animais e que em muitos casos as hipóteses levantadas para explicar as observações podem estar bastante equivocadas.

5.1.2 Liberação dos oócitos

Os dados sobre a forma de produção e liberação de oócitos para medusas de coronados são escassos. Jarms (*com. pes.*) comenta que para a espécie *Nausithoe marginata*, depois de um período de desova, a medusa volta a produzir oócitos após algumas semanas. Para *Linuche unguiculata*, Conklin (1908) observou que logo após a desova (esvaziamento total da gônada) as medusas morrem, e que a postura ocorria sempre de manhã (+/- 8h). Com isso *Nausithoe aurea* apresenta um modo diferente de produção de oócitos (produção contínua, ressaltando-se que esta observação refere-se a medusas mantidas em criação em laboratório). Isso pode ser, além de uma característica da espécie, uma resposta adaptativa para a seleção natural das medusas, frente ao esforço energético empregado na estrobilização, visando maximizar o resultado da reprodução sexuada, diferentemente, da reprodução assexuada, realizada pelos cifístomas através da produção de planulóides.

Os dados de Larson (1986) indicam que as cifomedusas coronadas oceânicas (*Atolla chuni* Vanhöffen, 1902, *Atolla wyvillei* Haeckel, 1880) do Oceano Austral ("Southern Ocean") produzem poucos gametas, e apresentam ovos de diferentes tamanhos nas gônadas, fazendo-o supor uma liberação contínua mas escassa dos mesmos. Russell (1959) e Mauchline & Harvey (1983) também observaram a ausência de reprodução sazonal para espécies de *Atolla*, respectivamente na Baía de Biscaia (França/Espanha), e

no Estreito de Rockall (Irlanda). Larson (1986) ainda afirma que, se existe uma sazonalidade na produção de gametas, esta provavelmente está relacionada com a sazonalidade das presas que alimentam as medusas. A produção contínua de ovos a uma baixa taxa pode estar relacionada com os dados apresentados por Jarms *et al.* (1999) para *Periphylla periphylla*. Os autores acreditam que o ciclo de vida da espécie tenha duração de várias décadas. Eckelbarger & Larson (1992) ressaltam que coronados de águas profundas (*Periphylla periphylla*, *Atolla* sp., *Nausithoe atlantica*) produzem poucos ovos por dia. Em contraste, *Linuche unguiculata* (uma espécie epipelágica), libera em excesso 100 ovos por dia (Kremer *et al.*, 1990). Com isso, o número de ovos liberados em média por *Nausithoe aurea* se enquadra entre os valores determinados para *Linuche unguiculata* e os outros 3 coronados considerados. Arai (1997:145) comenta que cífomedusas oceânicas apresentam produção de oócitos a uma baixa taxa por todo o ano enquanto que espécies neríticas, temperadas, apresentam uma sazonalidade fortemente marcada na produção de éfiras e gametas. Diante do que é conhecido sobre a biologia da reprodução sexuada, restrito às espécies mencionadas anteriormente, é importante lembrar que existe sazonalidade na gametogênese das medusas de *Linuche unguiculata*, pois a intensa estrobilização da espécie parece ser bem delimitada (Silveira & Morandini, 1998a). Para *Nausithoe aurea*, temos que considerar que: é uma espécie nerítica (cifístomas com zooxantelas), subtropical-tropical

(Morandini & Silveira, 1998), e cujas medusas adultas em laboratório foram mantidas até 55 dias; os cifístomas de *Nausithoe aurea* observados em laboratório, em diferentes datas ao longo do ano, sempre estrobilizaram alguns dias após a coleta na natureza produzindo também éfiras liberadas (*obs. pes.*); nas medusas maduras, por observação direta ("*in vivo*") ou análise histológica (ver item 5.2) sempre observou-se gônadas com gametas em diferentes estágios de maturação. Ampliando a discussão dos padrões para a reprodução sexuada de Scyphozoa por Arai (1997), sugere-se que *Nausithoe aurea* seja uma espécie nerítica com produção de gametas durante todo o ano e bastante prolífica. Talvez essa condição de *Nausithoe aurea* represente um novo padrão para a biologia reprodutiva: uma espécie, até agora, tida como subtropical-tropical. Permanece uma incógnita: qual é o provável fator de seleção que, aparentemente, mantém ausente do plâncton éfiras/medusas na região do Canal de São Sebastião e favorece os mecanismos de reprodução assexuada dos coronados (Silveira & Morandini, 1997; 1998a)?

5.1.3 Desenvolvimento embrionário

O muco produzido pelas fêmeas é uma característica geral de espécies com fecundação externa, que hipoteticamente serviria para a quimioatração dos espermatozóides (Avian & Rottini Sandrini, 1991) mantendo um grande número de oócitos agrupados e maximizando o

sucesso da fecundação. Uma outra idéia sobre a função dessa camada de muco ao redor dos oócitos seria contra a predação e autofagia. Contra a predação, foi observado que em laboratório os ovos liberados eram comidos pelos machos se mantidos em contato com eles por um período superior a aproximadamente uma hora; contra a autofagia, pode-se observar através dos cortes histológicos das medusas, que existe uma diferença entre a gastroderme que reveste a cavidade gastrovascular e a gastroderme dos filamentos gástricos, onde supõem-se haja maior atividade digestiva. Novamente utilizando observações sobre os materiais cultivados, observava-se um acúmulo maior de alimento próximo aos filamentos e que estes movimentavam-se para os locais onde havia alimento acumulado (por exemplo nos lóbulos). Desta forma, o muco protegeria os oócitos em seu deslocamento da gônada até o ambiente externo contra a ação digestiva dos filamentos gástricos das fêmeas.

Giese & Pearse (1974:5) comentam que, em geral, grupos de invertebrados com fecundação externa liberam o gameta feminino no estágio de oócito primário, e que a meiose só ocorre após a penetração do espermatozóide. Já Tardent (1985:175) afirma que a fecundação ocorre após o oócito ter completado a sua segunda divisão de maturação, ou seja um óvulo. Ao serem liberados os oócitos de *Nausithoe aurea* já apresentam 2 corpúsculos polares, e desta forma poderiam ser considerados oócitos secundários ou óvulos. A definição mais precisa do estágio do gameta

feminino fica difícil, pois o oócito com 2 corpúsculos polares pode ser: um oócito secundário já tendo ocorrido a divisão do 1º corpúsculo polar liberado; ou um óvulo com um dos 2 corpúsculos polares ainda por se dividir.

Como comentado na Introdução (item 1.2.) existem apenas 2 estudos que enfocam o desenvolvimento embrionário de espécies de Coronatae. Sendo que o trabalho de Conklin é muito mais completo e detalhado que o de Metschnikoff, que enfoca as espécies estudadas de forma comparativa.

Conklin (1908) ao estudar *Linuche unguiculata* (= *Linerges mercurius*) afirma que os ovos são liberados e fertilizados aproximadamente as 8 horas da manhã, e que estes ficam agrupados por um muco e que, geralmente, os ovos estão maduros quando liberados. Cada ovo apresenta uma membrana fina e transparente que persiste até o estágio de gástrula. Por fora desta membrana existem numerosos corpos marrons que o autor acredita que poderiam ser células foliculares; esses corpos marrons comentados pelo autor foram descritos mais tarde como sendo as zooxantelas que são transmitidas da fêmea para os ovos através do muco (Montgomery & Kremer, 1995). A liberação dos ovos geralmente se dá muito próxima à superfície da água. Quando as gônadas estão vazias as medusas assentam no fundo e morrem. Os ovos liberados apresentam em média 240µm de diâmetro. Eles são azuis ou azul-acinzentados. O autor comenta a existência de 2 tipos de esférulas de vitelo (grandes e pequenas).

Ao serem liberados os ovos já apresentam os corpúsculos polares. A segmentação é holoblástica, e a primeira e segunda clivagens são meridionais, enquanto que a terceira é equatorial. Em muitos casos os corpos polares permanecem próximos ao ovo dentro da membrana oolema.

Hargitt & Hargitt (1910) elaboraram um estudo sobre o ciclo de vida e o desenvolvimento de *Cyanea* e *Aurelia* e afirmam que os corpúsculos polares são formados pouco antes ou no momento da fertilização do oócito.

Mergner (1971:24) afirma que o caso típico de clivagem em Scyphozoa (tomando como exemplo *Aurelia aurita*) é holoblástica, quase igual e radial; mas coloca que em algumas espécies de *Aurelia* (Semaestomeae), *Lucernaria* e *Thaumatoscyphus distinctus* (Stauromedusae) pode ser observada uma clivagem pseudoespiral em complementação à típica clivagem radial. Desta forma a clivagem em *Nausithoe aurea* se encaixaria neste último tipo, sendo que a segmentação pseudoespiral ocorre após o estágio de 8 células.

Widersten (1965) afirma que a expulsão dos corpúsculos polares ocorre enquanto o oócito ainda está na camada mesogleial do ovário.

Baseado em seus materiais (*Periphylla periphylla* e espécies de *Atolla*) e adotando a sugestão de Berrill (1949), Larson (1986) sugere que ovos grandes seriam indicativos do desenvolvimento direto e portanto estas espécies não possuiriam um estágio de pólipo. Kramp (1968) sugere que o cifístoma *Stephanoscyphus simplex*, seria o possível estágio de pólipo da

medusa *Periphylla periphylla*; pois encontrou muitos cifístomas nas mesmas áreas em que foram coletadas as medusas. Porém, Larson (1986) indaga a questão: onde estariam os pólipos das espécies de *Atolla* (observando que *Periphylla periphylla*, *Atolla chuni* e *Atolla wyvillei* foram os materiais mais abundantes em suas amostras)? E o autor ainda questiona: por que cifomedusas oceânicas teriam pólipos, quando o desenvolvimento direto é uma possibilidade (baseando-se no tamanho dos ovos)? Recentemente Jarms *et al.* (1999) descreveram o ciclo de vida de *Periphylla periphylla* como sendo holopelágico. Sendo assim, as suposições de Larson para *Periphylla periphylla* estavam corretas.

A Tabela XIV apresenta uma comparação dos tamanhos dos oócitos obtidos neste estudo e na literatura para diferentes espécies de Scyphozoa.

5.2 HISTOLOGIA

Maas (1897) comenta sobre a dificuldade de interpretação dos cortes e que os melhores cortes seriam os no sentido proximal à origem da gônada (transversais).

Hargitt & Hargitt (1910) também comentam sobre a dificuldade de interpretação dos cortes histológicos e ressaltam que suas observações foram exclusivamente baseadas em estudos em laboratório.

Neves (1998) comenta que, ao utilizar a técnica de coloração por Tricrômico de Mallory com contracoloração com Hematoxilina de Weigert, observou uma boa diferenciação dos núcleos, porém as demais estruturas apresentavam-se em tons de rosa, impossibilitando a diferenciação entre os diferentes oócitos.

Tabela XIV. Comparação do tamanho dos ovos e tipo de gastrulação em diferentes espécies de Scyphozoa. Onde: (lib) = tamanho dos ovos liberados; (cortes) = tamanho dos ovos em cortes histológicos; - = informação ausente; ing = ingresso; inv = invaginação; del = delaminação; * = espécies com desenvolvimento direto. # medida e gastrulação confirmadas em Mayer (1910).

Ordem	Espécie	Ø ovo (µm)	Gastrulação	Autor
Coronatae	<i>Atolla parva</i>	1300	-	Repelin, 1966
	<i>Atolla vanhoeffeni</i>	1000	-	Russell, 1970
	<i>Atolla wyvillei</i>	1000	-	Russell, 1970
	<i>Linuche unguiculata</i>	240 (lib)	inv-ing	Conklin, 1908
	<i>Nausithoe aurea</i>	132-208 (lib)	ing multipolar	presente estudo
	<i>Nausithoe globifera</i>	250	-	Russell, 1970
	<i>Nausithoe marginata</i>	230	inv	Metschnikoff, 1886
	<i>Nausithoe racemosa</i>	400 (cortes)	-	Komai & Tokuoka, 1939
	<i>Periphylla periphylla</i> *	1200	-	Maas, 1897
		1000-1300	-	Russell, 1970
		1280-1680	del	Jarms <i>et al.</i> , 1999
Rhizostomeae	<i>Cassiopea andromeda</i>	140-170 (lib)	-	Gohar & Eisawy, 1960
	<i>Cotylorhiza tuberculata</i>	120	ing-inv	Goette, 1887 <i>apud</i> Berril (1949)# Claus, 1883
		140-160	-	Kikinger, 1992
		<i>Mastigias papua</i>	-	ing-inv
	<i>Rhizostoma pulmo</i>	140-180	-	Widersten, 1965
		150-180	-	Avian & Rottini Sandrini, 1991
	Semaestomeae	<i>Aurelia aurita</i>	150-230	ing-inv
-			inv	Hargitt & Hargitt, 1910
160			-	Widersten, 1965
160-180			-	Avian & Rottini Sandrini, 1991
<i>Chrysaora hysoscella</i>		47	ing	Teissier, 1929
<i>Chrysaora quinquecirrha</i>		70-190 (lib)	inv	Littleford, 1939
<i>Cyanea capillata</i>		120-150	ing	Hyde, 1894
		-	inv	Hargitt & Hargitt, 1910
		130-180	-	Widersten, 1965
<i>Discomedusa lobata</i>		150-180	-	Avian & Rottini Sandrini, 1991
<i>Pelagia noctiluca</i> *		250-320	-	Avian & Rottini Sandrini, 1991
	300	inv	Goette, 1893	
Stauromedusae	<i>Haliclystus octoradiatus</i>	30	ing	Wietrzykowski, 1912

5.2.1 Estrutura geral da gônada

Tardent (1985), em relação ao sítio da gametogênese, comenta que Cnidaria não apresenta gônadas verdadeiras, e que a gametogênese pode ocorrer em espaços intraepiteliais ou na matriz extracelular (mesogléia). A gametogênese, em geral, ocorre próxima à cavidade gastrovascular, e qualquer célula somática próxima a um oócito pode servir como fonte de precursores para a síntese de vitelo.

A estrutura geral da gônada de *Nausithoe aurea* concorda com as descrições existentes para outras espécies de Coronatae (Haeckel, 1881; Claus, 1883; Maas, 1897; Vanhöffen, 1902; Eckelbarger & Larson, 1992) e outros Scyphozoa (Hargitt & Hargitt, 1910; Widersten, 1965; Avian & Rottini Sandrini, 1991; Kikinger, 1992; Eckelbarger, 1994). Stiasny (1934; 1940) comenta sobre os diferentes estágios de desenvolvimento e maturação das gônadas nos diferentes estágios de crescimento de *Periphylla periphylla*.

Haeckel (1881) discute o desenvolvimento da gônada e apresenta comentários superficiais sobre a histologia de *Periphylla*, *Atolla* e de *Nausithoe* (*Nauphanta*) *challengeri*, chamando a região onde a gônada está "ancorada" ao assoalho da cavidade gastrovascular de "epitélio germinativo". Comenta que a estrutura fina (histologia) e o desenvolvimento das "Discomedusae - Cannostomae" [*Nausithoe* (*Nauphanta*) + *Atolla*] são em geral muito semelhantes às "Peromedusae"

(*Periphylla*), que eram considerados grupos separados e que posteriormente foram agrupados formando a ordem Coronatae.

Claus (1883) denomina a região de contato gônada-assoalho da cavidade gastrovascular de "*Suspensorium*" (= "*Sterigma*" de Haeckel).

Maas (1897) apresenta um estudo bastante detalhado da histologia de *Periphylla periphylla* e de algumas espécies de *Atolla*. Para *Periphylla* o autor enfatiza as observações sobre a "duplicação" da gastroderme que envolve a gônada e os gametas em desenvolvimento (chamando a região de duplicação de "*Duplicator*"). Denomina a região de contato gônada-assoalho da cavidade gastrovascular de **zona germinativa** ("*Keimzone*"), sendo esta a denominação adotada neste estudo para designar tal região. Comenta que a maneira pela qual é formada a gônada seria uma característica específica.

Vanhöffen (1902) comenta que as gônadas de *Atolla* e *Periphylla* são semelhantes, contrariando as afirmações de Maas (1897). Discute a origem dos gametas como sendo ectodérmica, pois não viu nenhum epitélio germinativo gastrodérmico.

Widersten (1965) define a gônada como apresentando 3 camadas: (1) - adjacente a cavidade gastrovascular que forma uma continuação direta com a gastroderme em geral; (2) - sob esta camada de células cilíndricas está a mesogléia pertencente ao interior da gônada; e (3) - no lado subumbrelar da mesogléia e demarcando esta do seio genital reside o

epitélio genital. Apesar de o estudo de Widersten (1965) ser o mais completo dentro de Scyphozoa, o autor não trata de espécies de Coronatae. Porém as suas informações servem como base para comparação entre os grupos por ele estudados (Semaestomeae e Rhizostomeae) e Coronatae (generalizando para o grupo as observações sobre *Nausithoe aurea* e de outras espécies com dados obtidos da literatura).

5.2.2 Espermatogênese

A estrutura geral do folículo testicular de *Nausithoe aurea* e a disposição das células nestes assemelha-se às descrições feitas por Claus (1883) para *Nausithoe punctata*, Widerstem (1965) para *Cyanea capillata*, *Cyanea palmstruchii*, e *Aurelia aurita*, e Kikinger (1992) para *Cotylorhiza tuberculata*.

Claus (1883) comenta que a estrutura da gônada masculina é semelhante à da gônada feminina, porém a camada de mesoglêia é mais reduzida, devido à própria organização dos folículos testiculares. O autor relata que em cortes oral-aboral observa-se o coalescimento dos folículos, acredita-se que esta coalescência relatada pelo autor possa ser um erro de interpretação dos cortes. Maas (1897) discute as observações para *Pelagia* onde foi encontrado um canal genital nas gônadas masculinas, canal este não observado em seus materiais (*Atolla* e *Periphylla*).

Arai (1997:143) citando alguns autores, comenta que os espermatozóides desenvolvem-se em folículos testiculares que são formados a partir de invaginações da parede da gônada masculina. Ao conferir-se esta informação em alguns dos trabalhos por ela citados (Widersten, 1965), constatou-se que a autora cometeu um engano ao interpretar as figuras. Vanhöffen (1902) comenta que nos machos os folículos não surgem da parede da gônada e sim individualizam-se na mesoglêia. Widersten (1965:49), Lesh-Laurie & Suchy (1991:225) e Kikinger (1992:343) afirmam que os folículos são formados pela imigração de células do "epitélio genital" para a camada de mesoglêia da gônada.

Os espermatozóides de *Nausithoe aurea* encontram-se individualizados e não em pacotes ("*spermatozeugmata*") como ocorre por exemplo em *Cotylorhiza tuberculata* (Kikinger, 1992) e em *Cassiopea andromeda* (Gohar & Eisawy, 1960). Algumas considerações quanto à ultra-estrutura do espermatozóide de uma espécie de *Nausithoe*, através de microscopia eletrônica, são feitas por Afzelius & Franzén (1971). A região do espermatozóide de *Nausithoe aurea* observada como não adquirindo coloração corresponde no estudo de Afzelius & Franzén (1971) à região onde localizam-se as mitocôndrias.

5.2.3 Oogênese

Claus (1883) comenta que nas gônadas femininas de *Nausithoe punctata* (= *Nausithoe albida* segundo Haeckel, 1880 e Mayer, 1910) existem diferenças entre a porção aboral (camada mais espessa com células colunares) e oral (camada mais fina e vacuolizada). Comenta que este aspecto vacuolizado do epitélio que reveste a porção aboral do seio genital pode ser decorrente de uma atividade secretora. Temos assim um reforço da interpretação para a natureza secretora de muco nessas células. O autor relata uma diferenciação do epitélio da região do "*Suspensorium*" em um epitélio ou zona germinativa ("*Keimepitel*"). Os oócitos migrariam para a mesoglêia a partir desta zona, e o autor relata que os oócitos maduros ocupam a porção mediana da gônada. Em cortes oral-aboral a abertura do seio genital encontra-se em uma posição adaxial (próxima à boca).

Maas (1897) observou um gradiente de maturação dos oócitos em direção aos lados livres das gônadas (corte oral-aboral = longitudinal). Ele relata as diferenças nas propriedades tintoriais dos corpos citoplasmáticos (vitelo) dos oócitos em diferentes graus de maturação. Para as espécies de *Atolla* a gônada é uma estrutura saciforme com a abertura voltada para a margem da medusa e coloca que os oócitos mais desenvolvidos ocupam a porção mediana da gônada. Relata também a diferença nas propriedades de coloração da camada "*Duplicator*" em relação às demais camadas. A gônada é composta por um epitélio gastrodérmico alto voltado para a

porção exumbrelar ("*en fa I*") e por uma camada gastrodérmica baixa e mais fina ("*en fa II*"). Comenta que os oócitos estão envoltos por 2 camadas distintas de mesogléia, e que não tem nenhuma informação sobre a gônada masculina.

Vanhöffen (1902) comenta que nas fêmeas os oócitos estão presos à parede da gônada por um pedúnculo (erro de interpretação ou artefato?).

Hargitt & Hargitt (1910) mostram que os oócitos em *Aurelia* permanecem ancorados ao epitélio até a sua completa maturação, e que não foram observados os corpúsculos polares em cortes histológicos (o que também não foi observado neste estudo).

De acordo com Eckelbarger (1994) uma das diferenças entre as diferentes ordens de Scyphozoa seria a maneira pela qual são nutridos os oócitos na gônada feminina. A espécie estudada encaixa-se dentro do padrão definido para Coronatae (oócitos livres na mesogléia sem associação com células subsidiárias = trofócitos).

5.2.4 Desenvolvimento embrionário e gastrulação

Segundo Conklin (1908) a gastrulação de *Linuche unguiculata* geralmente se dá por invaginação. Algumas vezes a gastrulação se dá por imigração de uma massa de células endodérmicas no pólo vegetativo. O pólo de maturação torna-se o aboral ou "pólo ectodérmico" da gástrula e plânula, enquanto que o pólo oposto do ovo torna-se o oral ou "pólo endodérmico". O ovo e embrião são radialmente simétricos. As clivagens

são aproximadamente iguais e sincrônicas, a diferenciação inicial das células em clivagem consiste no aparecimento de células endodérmicas arredondadas no pólo vegetativo, enquanto que células ectodérmicas são longas, formando um epitélio colunar.

Para *Aurelia* (Hargitt & Hargitt, 1910) a gastrulação se dá principalmente por invaginação, mas este não é o único processo.

A Tabela XIV apresenta dados da literatura sobre os tipos de gastrulação para diversas espécies de Scyphozoa. Esta tabela reforça ainda mais a hipótese levantada por Berrill (1949) sobre a relação entre o tamanho do oócito e o tipo de gastrulação sofrida pelo embrião.

Ao comparar-se as "plânulas" (= embriões com 48 h) de *Nausithoe aurea* com plânulas de *Lophogorgia punicea* (Silveira, 1986) e com planulóides de *Nausithoe aurea* e outros oriundos de cifístomas não identificados de Rhizostomeae, pudemos observar que nas "plânulas" não existe uma lâmina basal perceptível. Frente a isto, ou o processo de gastrulação não foi finalizado, ou a lâmina basal é bastante delgada, e que, com a técnica empregada, não é possível a sua visualização. O objetivo do trabalho foi apenas de estabelecer o modo de gastrulação (surgimento da gastroderme) e não de se estudar a própria gástrula (= estereogástrula) ou seja, a plânula.

VI

CONCLUSÕES

VI - CONCLUSÕES

O gameta feminino, ao ser liberado, encontra-se no estágio de oócito secundário ou óvulo, pois já apresenta 2 corpúsculos polares.

O desenvolvimento embrionário segue o padrão para Scyphozoa, ou seja, clivagem holoblástica originando células iguais, tornando-se pseudoespiral a partir de 8 células.

A gastrulação ocorre por ingressão multipolar, não enquadrando-se na tendência observada por Berrill (1949): ovos grandes - invaginação, ovos pequenos - ingressão unipolar, ovos medianos - combinação dos processos.

A organização das gônadas enquadra-se no padrão proposto para Scyphozoa Coronatae, onde os oócitos permanecem na mesoglêia da gônada e sem associação com trofócitos.

A diferença entre as paredes da gônada feminina é que a gastroderme que reveste o seio genital produz muco que acompanha os oócitos que são liberados.

O ciclo de produção/liberação de gametas pelas medusas é contínuo, porém com oscilações (em laboratório). Isto pode ser uma resposta visando maximizar a fase sexuada em complementação com a reprodução assexuada dos cifístomas.

A disposição da musculatura coronal assemelha-se à de outras espécies do gênero.

A posição relativa das gônadas em relação ao sulco coronal e a musculatura é uma característica que complementa a descrição da espécie.

A espécie apresenta variações no número e disposição das gônadas, tentáculos e lóbulos marginais.

VII

CONSIDERAÇÕES FINAIS

VII - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo, com uma parte de cultivo de materiais vivos, apesar de ser claramente uma descrição da morfologia interna (anatomia histológica), demonstra que estudos de anatomia devem ser relacionados com aspectos da biologia dos organismos.

O trabalho poderá servir como ponto de partida para diferentes estudos da gametogênese e desenvolvimento embrionário de outras espécies de Scyphozoa existentes na costa brasileira. Bem como, servir de base para estudos do comportamento reprodutivo em laboratório com comparações na natureza. O trabalho ainda deixa algumas questões abertas: onde encontram-se as medusas de *Nausithoe aurea* na natureza? Quais são os fatores que favorecem o predomínio da reprodução assexuada dos coronados na região de São Sebastião? São estes fatores do ambiente ou são características intrínsecas das espécies? Qual é o comportamento reprodutivo e sexuado da espécie na natureza?

Estas questões só poderão ser respondidas quando forem encontradas as medusas na natureza. Porém esta espécie responde muito bem às condições laboratoriais, produzindo um grande número de indivíduos, e no futuro poderia ser utilizada para fins didáticos ou até mesmo como modelo para bioensaios.

VIII

GLOSSÁRIO

VIII - GLOSSÁRIO

Glossário dos termos aplicados para Coronatae (neste estudo), adaptado de Mayer (1910), Russell (1970), Jarms (1991), Arai (1997), Cornelius (1997).

Em itálico encontram-se os termos em português e entre parênteses os termos em inglês, caso tenham sido retirados da literatura. Quando um termo faz referência a algum outro (*) este também encontra-se no glossário.

ABORAL *(aboral) = oposto à boca.

AD-RÁDIO (adradius) = cada um dos oito raios terciários situados entre um perrádio e um inter-rádio; dividem a umbrela em oito setores iguais e simétricos.

ADAXIAL (adaxial) = relativo à superfície interna de uma estrutura, voltada para o centro da medusa, por exemplo de um tentáculo.

CAVIDADE GASTROVASCULAR (gastric cavity) = compreende o estômago posicionado centralmente, e as bolsas gástricas separadas por septos (sistema gástrico aberto).

CORTES EM SENTIDO ORAL-ABORAL = cortes "longitudinais" realizados no sentido oral-aboral da medusa.

CORTES TRANSVERSAIS = cortes ao corpo da medusa, tomando como referência o eixo/plano oral-aboral e que é interceptado perpendicularmente.

DISCO CENTRAL (central disk) = região central da exumbrela da medusa delimitada pelo sulco coronal, podendo ser alta ou achatada.

ESPINHOS PERIDÉRMICOS (internal teeth; periderm teeth; cusps)= projeções internas da parede do tubo peridérmico, podem estar isoladas ou organizadas em séries transversais.

FILAMENTO GÁSTRICO (gastric filament) = curtos filamentos localizados em grupos (facélas) no assoalho do estômago (sinônimo = cirros gástricos).

GÔNADA (gonad) = projeção digitiforme da gastroderme do assoalho da cavidade gastrovascular periférica aos filamentos gástricos, preenchida por mesogléia na qual desenvolvem-se os gametas (fêmeas ou machos); pode assumir diferentes formas, em geral saciforme.

INTER-RÁDIO (interradius) = cada um dos quatro raios secundários, situado entre dois perrádios.

MUSCULATURA CIRCULAR OU CORONAL (circular muscle, coronal muscle) = região da subumbrela que apresenta musculatura. Esta musculatura esta organizada em campos musculares (muscle fields) e estes por sua vez em dobras musculares (muscle folds).

ORAL *(oral) = próximo à boca, voltado para o lado da boca.

PEDÁLIOS (pedalia) = espessamentos radiais da mesogléia na região periférica da exumbrela, entre o sulco coronal e a base dos lóbulos marginais.

PERRÁDIO (perradius) = cada um dos quatro raios primários, na orientação das bolsas estomacais e dos cantos da boca, que dividem a umbrela em quatro setores iguais e simétricos (em Coronatae alinhados com a abertura dos óstios gástricos).

PLANULÓIDE (planuloid) = larva ovóide ou fusiforme, ciliada e de simetria radial oriunda de reprodução assexuada.

SEIO GENITAL (genital sinus) = espaço compreendido entre o assoalho da cavidade gastrovascular e a parede oral da gônada.

(*EX-*, *SUB-*) *UMBRELA** (umbrella) = o corpo em domo de uma medusa, excluindo as estruturas pendentes para baixo dele e os tentáculos marginais. Não há nenhuma clara distinção entre sino, umbrela e

disco, os últimos 2 sendo tipicamente aplicados às formas achatadas. A exumbrela, ou superfície exumbrelar, é aquela superior e do lado externo; a subumbrela, ou superfície subumbrelar, a inferior ou interna. O espaço cercado pelo sino de forma convexa é a cavidade subumbrelar, que está em continuidade com a própria água do mar circundante.

SULCO CORONAL (coronal furrow; coronal groove)= sulco separando a exumbrela em duas regiões (disco central e pedálios)

TUBO PERIDÉRMICO (periderm tube) = esqueleto externo quitinoso de origem epidérmica que envolve o corpo do cifístoma (pólipo).

IX

REFERÊNCIAS

IX - REFERÊNCIAS

- Afzelius, B. & Å. Franzén, 1971. The spermatozoon of the jellyfish, *Nausithoe*. **Journal of Ultrastructure Research**, **37**: 186-199.
- Allman, G.J., 1874. On the structure and systematic position of *Stephanoscyphus mirabilis*, the type of a new order of Hydrozoa. **Transactions of the Linnean Society of London, 2nd Series - Zoology**, **1**: 61-66, pl. 14.
- Arai, M.N., 1997. **A functional biology of Scyphozoa**. Chapman & Hall, London. xvi, 316 p.
- Avian, M. & L. Rottini Sandrini, 1991. Oocyte development in four species of scyphomedusa in the northern Adriatic Sea. **Hydrobiologia**, **216/217**: 189-195.
- Beams, H.W. & R.G. Kessel, 1983. Cnidaria. 31-66. In: Adiyodi, K.G. & R.G. Adiyodi (Eds.), **Reproductive biology of invertebrates, Volume I: Oogenesis, oviposition, and oosorption**. John Wiley & Sons Ltd. 770 p.
- Behmer, O.A.; E.M.C. Tolosa & A.G. Freitas Neto, 1976. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. Edart - Edusp. 241 p.
- Berrill, N.J., 1949. Developmental analysis of scyphomedusae. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, **24**: 393-410.
- Bigelow, H.B., 1909. Reports on the scientific results of the expedition to the eastern tropical Pacific, in charge of Alexander Agassiz, by the U.S. Fish Commission Steamer "Albatross", from October, 1904, to March, 1905, Lieut. commander L.M. Garrett, U.S.N., commanding. XVI The Medusae. **Memoirs of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College**, **37**: 1-243.

- Bouillon, J., 1993. Embranchement des Cnidaires (Cnidaria). 1-28. *In*: Doumenc, D. (Ed.). **Traité de Zoologie, Tome III, Cnidaires - Cténaires, fascicule 2**. Masson, Paris. 1117 p.
- Bumann, D. & G. Jarms, 1997. Localization of digestion activities in polyps of *Nausithoe planulophora* and *Thecoscyphus zibrowii* (Coronatae, Scyphozoa, Cnidaria). **Helgolaender Meeresuntersuchungen**, **51**: 477-485.
- Campbell, R.D., 1974. Cnidaria. 133-199. *In*: Giese, A.C. & J.S. Pearse, **Reproduction of marine invertebrates, Volume I: Acoelomate and pseudocoelomate metazoans**. Academic Press. 546 p.
- Chapman, D.M. & B. Werner, 1972. Structure of a solitary and a colonial species of *Stephanoscyphus* (Scyphozoa, Coronatae) with observations on periderm repair. **Helgolaender wissenschaftliche Meeresuntersuchungen**, **23**: 393-421.
- Claus, C., 1883. **Untersuchungen über die Organisation und Entwicklung der Medusen**. Prag & Leipzig. 96 p.
- Conklin, E.G., 1908. The habits and early development of *Linerges mercurius*. **Carnegie Institution of Washington Publication**, **103**: 155-170.
- Cornelius, P.F.S., 1997. Keys to the genera of cubomedusae and scyphomedusae (Cnidaria). 109-122. *In*: den Hartog, J.C. (ed.), **Proceedings of the 6th International Conference on Coelenterate Biology 1995**. Nationaal Natuurhistorisch Museum, Leiden. xviii, 542 p.

- Eckelbarger, K.J., 1994. Oocyte nutrition in the lower Metazoa: the Scyphozoa. 15-28. *In*: Wilson, W.H.; S.A. Stricker & G.L. Shinn, **Reproduction and development of marine invertebrates**. John Hopkins University Press. 325 p.
- Eckelbarger, K.J. & R.J. Larson, 1988. Ovarian morphology and oogenesis in *Aurelia aurita* (Scyphozoa: Semaestomeae): ultrastructural evidence of heterosynthetic yolk formation in a primitive metazoan. **Marine Biology**, **100**: 103-115.
- Eckelbarger, K.J. & R.J. Larson, 1992. Ultrastructure of the ovary and oogenesis in the jellyfish *Linuche unguiculata* and *Stomolophus meleagris*, with a review of ovarian structure in the Scyphozoa. **Marine Biology**, **114**: 633-643.
- Fautin, D.G., 1992. Cnidaria. 31-52. *In*: Adiyodi, K.G. & R.G. Adiyodi (Eds.), **Reproductive biology of invertebrates, Volume V: Sexual differentiation and behaviour**. John Wiley & Sons Ltd. 511 p.
- Fautin, D.G. & R.N. Mariscal, 1991. Cnidaria: Anthozoa. 267-358. *In*: Harrison, F.W. & J.A. Westfall (Eds), **Microscopic anatomy of invertebrates, Vol. 2: Placozoa, Porifera, Cnidaria, and Ctenophora**, Chapter 6. Wiley-Liss, Inc, New York. 436 p.
- Franc, A., 1993. Classe des Scyphozoaires. 597-884. *In*: Doumenc, D. (Dir.), **Traité de Zoologie, Tome III, Cnidaires - Cténaires, fascicule 2**. Masson, Paris. 1117 p.
- Franzén, Å., 1996. Ultrastructure of spermatozoa and spermiogenesis in the hydrozoan *Cordylophora caspia* with comments on structure and evolution of the sperm in the Cnidaria and the Porifera. **Invertebrate Reproduction and Development**, **29**(1): 19-26.

- Giese, A.C. & J.S. Pearse, 1974. Introduction. 1-49. *In*: Giese, A.C. & J.S. Pearse, **Reproduction of marine invertebrates, Volume I: Acoelomate and pseudocoelomate metazoans**. Academic Press. 546 p.
- Goette, A. 1893. Vergleichende Entwicklungsgeschichte von *Pelagia noctiluca* Pér.. **Zeitschrift fur wissenschaftliche Zoologie**, **55**: 645-695.
- Gohar, H.A.F. & A.M. Eisawy, 1960. The development of *Cassiopea andromeda*. **Publications Marine Biological Station, Al-Ghardaqa**, **11**: 148-190.
- Haeckel, E., 1880. **Das system der medusen. I, 2: System der Acraspeden**. Gustav Fischer, Jena. pp. 361-672.
- Haeckel, E., 1881. Report on the deep-sea medusae dredged by H.M.S. Challenger, during the years 1873-1876. *In*: Thomson, C.W. & J. Murray, 1882. **Report on the scientific results of the voyage of H.M.S. Challenger during the years 1873-1876. Zoology - Volume IV, 2**: 1-154.
- Hargitt, C.W. & G.T. Hargitt, 1910. Studies in the development of scyphomedusae. **Journal of Morphology**, **21**(1): 217-262.
- Hedwig, M. & W. Schäfer, 1986. Vergleichende Untersuchungen zur Ultrastruktur und zur phylogenetischen Bedeutung der Spermien der Scyphozoa. **Zeitschrift für zoologische Systematik und Evolutionsforschung**, **24**: 109-122.
- Hinsch, G.W., 1974. Comparative ultrastructure of cnidarian sperm. **American Zoologist**, **14**: 457-465.
- Hyde, J.H., 1894. Entwicklungsgeschichte einiger Scyphomedusen. **Zeitschrift fur wissenschaftliche Zoologie**, **58**: 531-565.

- Hyman, L.H., 1940. **The invertebrates, Volume I: Protozoa through Ctenophora**. MacGraw- Hill, New York. x, 726 p.
- Jarms, G., 1990. Neubeschreibung dreier Arten der Gattung *Nausithoe* (Coronata, Scyphozoa) sowie Wiederbeschreibung der Art *Nausithoe marginata* Klliker, 1853. **Mitteilungen aus dem hamburgischen zoologischen Museum und Institut**, **87**: 7-39.
- Jarms, G., 1991. Taxonomic characters from the polyp tubes of coronate medusae (Scyphozoa, Coronatae). **Hydrobiologia**, **216-217**: 463-470.
- Jarms, G., 1997. The polyps of Coronatae (Scyphozoa), a review and some new results. 271-278. In: den Hartog, J.C. (ed.), **Proceedings of the 6th International Conference on Coelenterate Biology 1995**. Nationaal Natuurhistorisch Museum, Leiden. xviii, 542 p.
- Jarms, G.; U. Bnstedt; H. Tiemann; M.B. Martinussen & J.H. Foss, 1999. The holopelagic life cycle of the deep sea medusa *Periphylla periphylla* (Scyphozoa, Coronatae). **Sarsia**, **84**(1): 55-65.
- Kawaguti, S. & F. Yoshimoto, 1973. Electron microscopy on a scyphozoan, *Stephanoscyphus racemosus*. **Biological Journal Okayama University**, **16**: 47-66.
- Kessel, R.G., 1968. Electron microscope studies on developing oocytes of a coelenterate medusa with special reference to vitellogenesis. **Journal of Morphology**, **126**: 211-248.
- Kikinger, R., 1992. *Cotylorhiza tuberculata* (Cnidaria: Scyphozoa) - life history of a stationary population. **P.S.Z.N. I: Marine Ecology**, **13**(4): 333-362.

- Kikinger, R. & L. von Salvini-Plawen, 1995. Development from polyp to stauromedusa in *Stylocoronella* (Cnidaria: Scyphozoa). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, **75**: 899-912.
- Komai, T., 1935. On *Stephanoscyphus* and *Nausithoe*. **Memoirs of the College of Science, Kyoto Imperial University, Series B**, **10**(5): 290-339.
- Komai, T. & Y. Tokuoka, 1939. Further observations on the strobilation of *Stephanoscyphus*. **Memoirs of the College of Science, Kyoto Imperial University, Series B**, **15**(2): 127-133.
- Kramp, P.L., 1959. *Stephanoscyphus* (Scyphozoa). **Galathea Report**, **1**: 173-185.
- Kramp, P.L., 1961. Synopsis of the medusae of the world. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, **40**: 7-469.
- Kramp, P.L., 1962. Reports from the Lund University Chile expedition 1948-49. 44. *Stephanoscyphus corniformis* Komai (Scyphozoa). **Lunds Universitets Årsskrift N.F. Avd. 2.**, **58**(6): 3-4.
- Kramp, P.L., 1968. The scyphomedusae collected by the Galathea expedition 1950-52. **Videnskabelige Meddelelser fra Dansk Naturhistorik Forening i Kobenhavn**, **131**: 67-98.
- Kremer, P.; J. Costello; J. Kremer & M. Canino, 1990. Significance of photosynthetic endosymbionts to the carbon budget of the scyphomedusa *Linuche unguiculata*. **Limnology and Oceanography**, **35**(3): 609-624.
- Larson, R.J., 1979. Feeding in coronate medusae (Class Scyphozoa, Order Coronatae). **Marine Behaviour and Physiology**, **6**: 123-129.

- Larson, R.J., 1986. Pelagic Scyphomedusae (Scyphozoa: Coronatae and Semaestomeae) of the Southern Ocean. *In*: Kornicker, L.S. (Ed.), *Biology of the Antarctic Seas XVI. Antarctic Research Series*, **41**: 59-165.
- Larson, R.J.; C.E. Mills & G.R. Harbison, 1989. *In situ* foraging and feeding behaviour of Narcomedusae (Cnidaria, Hydrozoa). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **69**: 785-794.
- Lesh-Laurie, G.E. & P.E. Suchy, 1991. Cnidaria: Scyphozoa and Cubozoa. 185-266. *In*: Harrison, F.W. & J.A. Westfall (Eds), *Microscopic anatomy of invertebrates, Vol. 2: Placozoa, Porifera, Cnidaria, and Ctenophora*, Chapter 5. Wiley-Liss, Inc, New York. 436 p.
- Lightner, D.V., 1996. *A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for disease of cultured penaeid shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA (sem paginação).
- Littleford, R.A., 1939. The life cycle of *Dactylometra quinquecirrha*, L.Agassiz in the Chesapeake Bay. *The Biological Bulletin (Woods Hole)*, **77**: 368-381.
- Lo Bianco, S. & P. Mayer, 1890. *Spongicola* und *Nausithoe*. *Zoologischer Anzeiger*, **8**: 687-688.
- Maas, O., 1897. Reports on an exploration off the coasts of Mexico, Central and South America, and off the Galapagos Islands, in charge of Alexander Agassiz, by the U.S. Fish Commission Steamer "Albatross", during 1891, Lieut. Commander Z.L. Tanner, U.S.N., commanding. XXI. Die medusen. *Memoirs of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College*, **23**(1): 1-92.

- Mahoney, R., 1973. Histological Techniques. 177-266. *In: Laboratory Techniques in Zoology*. London, Butterworth & Co. 404 p.
- Marques, A.C., 1997. **Evolução basal nos Metazoa, com ênfase nas relações entre os Cnidaria**. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. xiii, 415 p.
- Matsuno, A. & S. Kawaguti, 1991. An ultrastructural study of the polyp and strobila of *Atorella japonica* (Cnidaria, Coronatae) with respect to muscles and nerves. **Hydrobiologia**, **216-217**: 39-43.
- Mauchline, J. & P.H. Harvey, 1983. The scyphomedusae of the Rockall Trough, northeastern Atlantic Ocean. **Journal of Plankton Research**, **5(6)**: 881-890.
- Mayer, A.G., 1910. **The Medusae of the world III. The scyphomedusae**. Carnegie Institution, Washington D.C. 499-735.
- Meglitsch, P.A. & F.R. Schram, 1991. **Invertebrate Zoology**. 3rd edition. Oxford University Press. Oxford. 623 p.
- Mergner, H., 1971. Cnidaria. 1-84. *In: Reverberi, G., Experimental embryology of marine and fresh-water invertebrates*. North Holland Publ. Co., Amsterdam. 587 p.
- Metschnikoff, E., 1886. **Embryologische Studien an Medusen, ein Beitrag zur Genealogie der Primitiv-organe**. A.Hölder. Wien. 159 p.
- Miller, R.L., 1983. Cnidaria. 23-73. *In: Adiyodi, K.G. & R.G. Adiyodi (Eds.), Reproductive biology of invertebrates, Volume II: Spermatogenesis and sperm function*. John Wiley & Sons Ltd. 692 p.

- Montgomery, M.K. & P.M. Kremer, 1995. Transmission of symbiotic dinoflagellates through the sexual cycle of the host scyphozoan *Linuche unguiculata*. **Marine Biology**, **124**: 147-155.
- Morandini, A.C. & F.L. da Silveira, 1998. Primeira ocorrência de cifozoários coronados para o litoral sul da Bahia. *In: Congresso Brasileiro de Zoologia*, **XXII**, Recife, 1998. **Resumos**, Recife, UFPE e SBZ. pp.7.
- Neves, E.G., 1998. **Comportamento reprodutivo de *Mussismilia hispida* (Verril, 1902) (Cnidaria, Anthozoa, Scleractinia)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. xii, 91 p.
- Pantin, C.F.A., 1948. **Notes on microscopical technique for zoologists**. Cambridge University Press. Cambridge, 77 p.
- Repelin, R., 1965. La meduse *Paraphyllina ransoni* dans le Vallée du Trou sans Fond (Côte d'Ivoire). **Cahiers ORSTOM Oceanographie**, **3**: 81-86.
- Repelin, R., 1966. Scyphomeduses Atollidae du Bassin de Guinée. **Cahiers ORSTOM Oceanographie**, **4**: 21-33.
- Ruppert, E.E. & R.D. Barnes, 1994. **Invertebrate Zoology**. 6th edition. Saunders College Publishing. xii, 1056 p.
- Russell, F.S., 1956a. On a new scyphomedusa, *Paraphyllina ransoni* n.sp.. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, **35**: 105-111.
- Russell, F.S., 1956b. On the scyphomedusae *Nausithoë atlantica* Broch and *Nausithoë globifera* Broch. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, **35**: 363-370.

- Russell, F.S., 1959. Some observations on the scyphomedusa *Atolla*. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, **38**: 33-40.
- Russell, F.S., 1970. **The medusae of the British Isles II. Pelagic Scyphozoa with a supplement to the first volume on hydromedusae**. Cambridge University Press. London. xii, 284 p.
- Shostak, S., 1993. Cnidaria. 45-105. *In*: Adiyodi, K.G. & R.G. Adiyodi (Eds.), **Reproductive biology of invertebrates, Volume VI, Part A: Asexual propagation and reproductive strategies**. John Wiley & Sons Ltd.
- Silveira, F.L. da, 1986. **Aspectos da biologia de *Lophogorgia punicea* (Milne Edwards & Heime, 1857) (Gorgonacea, Gorgoniidae) do canal de São Sebastião, Estado de São Paulo**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo. 211 p.
- Silveira, F.L. da & A.C. Morandini, 1996. *Stephanoscyphistoma corniformis* (Komai, 1936) (Cnidaria, Scyphozoa, Coronatae) from the north coast of São Paulo, Brazil. **Semina, Ciências Biológicas/Saúde**, **17**(2): 137-145.
- Silveira, F.L. da & A.C. Morandini, 1997. *Nausithoe aurea* n. sp. (Scyphozoa, Coronatae, Nausithoidae), a species with two pathways of reproduction after strobilation: sexual and asexual. **Contributions to Zoology**, **66**(4): 235-246.
- Silveira, F.L. da & A.C. Morandini, 1998a. Unknown asexual reproductive mechanisms in *Linuche unguiculata* (Swartz, 1788) (Scyphozoa: Coronatae): planuloid formation through strobilation and segmentation. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, **111**(4): 781-794.

- Silveira, F.L. da & A.C. Morandini, 1998b. New observations on dormancy mechanisms in *Linuche unguiculata* (Swartz, 1788) (Scyphozoa: Coronatae). **Boletim do Museu Nacional, Nova Série, Zoologia**, **393**: 1-7.
- Stiasny, G., 1934. Scyphomedusae. **Discovery Reports**, **8**: 329-396.
- Stiasny, G., 1940. Die scyphomedusen. **Dana Report**, **18**: 3-28.
- Tardent, P., 1985. The differentiation of germ cells in Cnidaria. 163-197. *In*: Halvorson, H.P. & A. Monroy (Eds.), **The origin and evolution of sex**. Alan R. Liss Inc., New York.
- Teissier, G., 1929. La croissance embryonnaire de *Chrysaora hysoscella* (L.). **Archives de Zoologie Expérimentale et Générale**, **69**: 137-178.
- Thiel, H., 1966. The evolution of Scyphozoa: a review. **Symposia of the Zoological Society of London**, **16**: 77-117.
- Uchida, T., 1926. Anatomy and development of a rhizostome medusa *Mastigias papua* L.Agassiz, with observations on the phylogeny of Rhizostomae. **Journal of the Faculty of Science, Imperial University of Tokyo, Section IV – Zoology**, **1**(1): 45-95.
- UNEP, 1991. Jellyfish blooms in the Mediterranean. Proceedings of the II Workshop on Jellyfish in the Mediterranean Sea, UNEP, Jellyfish blooms in the Mediterranean, **MAP Technical Reports Series**, **47**: 1-320.
- Vanhöffen, E., 1902. Die Acraspeden Medusen der Deutschen Tiefsee-Expedition 1898-1899. **Wissenschaftliche Ergebnisse der Deutschen Tiefsee-Expedition auf dem dampfer Valdivia 1898-1899**, **3**: 3-52.

- Werner, B., 1970. Contribution to the evolution in the genus *Stephanoscyphus* (Scyphozoa Coronatae) and ecology and regeneration qualities of *Stephanoscyphus racemosus* Komai. **Publications of the Seto Marine Biological Laboratory**, 18(1): 1-20.
- Werner, B., 1973. New investigations on systematics and evolution of the class Scyphozoa and the phylum Cnidaria. **Publications of the Seto Marine Biological Laboratory**, 20: 35-61.
- Werner, B., 1979. Coloniality in the Scyphozoa: Cnidaria. 81-103. In: Larwood, G. & B.R. Rosen (Eds.), **Biology and systematics of colonial organisms**. Academic Press, London. 589 p.
- Werner, B., 1984. Stamm Cnidaria, Nesseltiere. 11-305. In: **Lehrbuch der Speziellen Zoologie** (co-ordinated by A. Kaestner), Band I, **Wirbellose Tiere** (edited by H.-E. Gruner), 2 Teil, **Cnidaria, Ctenophora, Mesozoa, Plathelminthes, Nemertini, Entoprocta, Nemathelminthes, Priapulida**. G. Fisher, Stuttgart. 621 p.
- Werner, B. & J. Hentschel, 1983. Apogamous life cycle of *Stephanoscyphus planulophorus*. **Marine Biology**, 74: 301-304.
- Widersten, B., 1965. Genital organs and fertilization in some Scyphozoa. **Zoologiska Bidrag från Uppsala**, 37: 45-58.
- Wietrzykowski, W., 1912. Développement des Lucernaires. **Archives de Zoologie Expérimentale et Générale, séries 5**, 10: 1-95.
- Wrobel, D. & C.E. Mills, 1998. **Pacific coast pelagic invertebrates. A guide to the common gelatinous animals**. Sea Challengers & Monterey Bay Aquarium, Monterey. i-iv, 1-108.

X

APÊNDICE

APÊNDICE

Neste apêndice estão incluídas a metodologia para as preparações de diferentes corantes que foram empregados como teste durante a realização do trabalho, e a apresentação de seus resultados de forma sucinta.

Metodologia

Preparação dos corantes

- Eosina-Floxina (Lightner, 1996)
 - Eosina (estoque) = eosina amarela solução aquosa 1%
 - Floxina (estoque) = floxina solução aquosa 1%
 - Solução de trabalho = 100 ml de Eosina + 10 ml de Floxina + 780 ml de etanol 95% + 4 ml de ácido acético glacial.
- Hematoxilina de Harris (Behmer; Tolosa & Freitas Neto, 1976)
 - Hematoxilina cristalizada (5 g) + Etanol 95% (100 ml) + Sulfato de Alumínio e Amônio (20 g) + Água destilada (1000 ml) + Ácido acético (2-4 ml) + Óxido de Mercúrio - vermelho - (3 g)
 - Filtrar antes do uso.
- Hematoxilina de Mayer-Bennett (Lightner, 1996)
 - Água destilada quente (2000 ml) + Hematoxilina (2 g) + Iodato de Sódio (0,4 g) + Sulfato Potássio-Alumínio (180 g) + Ácido Cítrico (2 g) + Hidrato cloral (100 g)
 - Misturar os reagentes na ordem listada; pronto para o uso quando completado
- Hematoxilina de Weigert (Behmer; Tolosa & Freitas Neto, 1976)
 - Solução A - 1 g de Hematoxilina + 100 ml de etanol 95%.
 - Solução B - 1000 ml de água destilada + 40 ml Cloreto de Ferro 30% (24 g) + 10 ml Ácido clorídrico.
 - Misturar as soluções A e B (1:1) na hora do uso.
- Tricrômico de Mallory (Behmer; Tolosa & Freitas Neto, 1976)
 - Solução A – Fucsina ácida (solução aquosa 0,5%) (0,5 g + 100 ml de água destilada).
 - Solução B – Azul de anilina (0,5 g) + Laranja G (2 g) + Ácido fosfotúngstico (1 g) + 100 ml de água destilada.
- Tricrômico de Gomori (Behmer; Tolosa & Freitas Neto, 1976)

- Comotrope 2R (0,6 g) + Verde luz S.F. ou Fast Green (0,3 g) + Ácido fosfotúngstico (0,6 g) + Ácido acético glacial (1 ml) + água destilada (100 ml)

Deixar repousar durante 24 horas e depois filtrar

Coloração e montagem

Para a coloração dos cortes, as lâminas foram tratadas como descrito a seguir (no item Resultados, são apresentadas as observações das diferentes combinações de corantes, que foram executadas da mesma maneira que as descritas abaixo):

1 - Hematoxilina-Eosina (HE) (adaptado de Behmer; Tolosa & Freitas Neto, 1976).

- desparafinar em Xilol (3 banhos);
- hidratação em série ascendente de etanol;
- coloração com Hematoxilina de Harris (40 min.);
- azular em água de torneira (20 min.);
- coloração com Eosina-Floxina (5 min.);
- desidratação em série ascendente de Etanol;
- 2 banhos em Xilol;
- montagem da lâmina com Permount®.

2 - Hematoxilina de Weigert + Tricrômico de Mallory (W+M) (adaptado de Mahoney, 1973).

- desparafinar em Xilol (3 banhos);
- hidratação em série descendente de etanol;
- coloração em Hematoxilina de Weigert (40 min.);
- azular os cortes em água de torneira (15 min.);
- contra coloração em Tricrômico de Mallory soluções A e B (5 e 20 min.);
- desidratação em série ascendente de Etanol;
- 2 banhos em Xilol;
- montagem da lâmina com Permount®.

As demais misturas de corantes foram feitas utilizando-se como base a metodologia utilizada em HE e W+M.

Refixação

Fixador de Bouin (Behmer; Tolosa & Freitas Neto, 1976)

- Aldeído fórmico 37-40% (250 ml) + Ácido pícrico solução aquosa saturada (750 ml) + Ácido acético (5 ml)

Fixar de 4 a 12h; depois de fixado o material, manter em etanol 50% de 4 a 6h; se os cortes estiverem amarelados, lavar em etanol 70% com solução aquosa saturada de Carbonato de Lítio

Fixador de Zamboni (técnica fornecida por D.T. Moraes – Depto Zoologia IB USP)

Solução 1 - 2% de Paraformaldeído em tampão Fosfato de Sorensen 0,1 M (TPS)

Solução 2 - Ácido Pícrico em água destilada (1,18 g + 100 ml)

Solução final = 850 ml de solução 1 + 150 ml de solução 2

fixar o tecido em Zamboni por perfusão ou imersão durante 9-18 horas a 4°C; lavar repetidamente (pelo menos 1 dia) os tecidos com PBS/Sucrose a 4°C. Os tecidos podem ser armazenados no tampão a 4°C por alguns meses; o Paraformaldeído (PF) dissolve-se na água utilizada para a diluição do TPS (partimos de uma solução de TPS 0,2M). A diluição do PF faz-se com agitação magnética, à temperatura de 60°C e juntando algumas gotas de Hidróxido de Sódio até a solução clarificar

Tampão Fosfato de Sorensen (TPS) – solução estoque a 0,2 M

A - Fosfato Ácido de Sódio Diidratado (15,6 g/500 ml água destilada)

B - Fosfato de Sódio (14,2 g/500 ml de água destilada)

Solução final a 0,2M (pH 7,2-7,4) = 140 ml de A + 360 ml de B

Tampão Fosfato Salino (PBS) pH 7,2-7,4

- dissolver em 10 litros de água destilada: Cloreto de Sódio (87,9 g) + Fosfato Ácido de Potássio (2,74 g) + Fosfato Dissódico ou Fosfato de Sódio Dibásico (11,35 g)

PBS/Sucrose

15 g de Sucrose + 0,01 g de Azida Sódica em 100 ml de PBS a 4°C

Resultados

Durante o decorrer do trabalho foram poucas as preparações histológicas que apresentavam um resultado ideal e homogêneo em termos de coloração e onde se pudesse qualificar os diferentes estágios celulares, tanto nas gônadas masculinas quanto nas femininas, nestas últimas a saber oócitos basófilos e acidófilos. Diante do apresentado, propôs-se utilizar uma nova série de corantes, preparados com reagentes novos adquiridos pelo Departamento de Zoologia, e que mostraram-se bons diante do esperado. Porém, diversos testes foram feitos, empregando diferentes combinações de corantes visando atingir um resultado ideal.

A experiência com o material mostrou que a refixação das medusas em solução de SUSA, previamente à preparação dos cortes histológicos, resulta em uma coloração um pouco mais intensa, em comparação com os

materiais exclusivamente fixados em solução de formaldeído 4%. Assim sendo, os materiais que foram utilizados para o período de análises-teste, foram exclusivamente refixados em SUSA antes dos demais tratamentos, excetuando-se alguns testes com Bouin e Zamboni (ver mais detalhes abaixo).

Utilizaram-se diferentes combinações de corantes visando a obtenção de melhores resultados, e estas serão apresentadas a seguir em ordem cronológica em que foram testadas.

Hematoxilina de Harris + Eosina-Floxina (HaE)

(Agosto 1998)

As lâminas preparadas com esta combinação de corantes apresentaram um resultado satisfatório quanto ao corante eosina-floxina. Já o resultado quanto à utilização da Hematoxilina de Harris foi bastante pobre, pois os núcleos das células reagiram pouco com o corante (estes que teriam uma maior afinidade com o corante); e as estruturas coradas com hematoxilina, que apresentariam uma coloração azulada após o banho em água de torneira (pH ligeiramente alcalino), ficavam de cor marrom claro, por maior que fosse o período do banho em água.

Hematoxilina de Harris + Tricrômico de Mallory (HaM)

(Setembro 1998)

Os cortes corados com esta combinação mostraram um resultado semelhante à combinação HaE, exceto que a afinidade pelo corante de Mallory foi pobre em relação à cor azul (mistura B), prevalecendo a cor rosada na mesoglêia e alaranjada nos oócitos basófilos. Diversas tentativas foram realizadas tentando adicionar um alcali (Bicarbonato de Lítio, Bicarbonato de Sódio, Hidróxido de Amônio) ao banho em água para se obter o azulamento ideal da hematoxilina nos núcleos e no citoplasma dos oócitos basófilos, porém não dando resultados positivos. Tentou-se, também, acelerar o envelhecimento da hematoxilina adicionando-se ácido acético, o que melhorou um pouco a cor azulada, porém os cortes não ficavam homogêneos em coloração.

Hematoxilina de Mayer-Bennett + Eosina-Floxina (HmbE)

(Outubro 1998)

As lâminas coradas com esta combinação mostraram-se melhores que as combinações HaE e HaM, mas a coloração azul esperada da hematoxilina ainda apresentava-se em tons de marrom.

Hematoxilina de Mayer-Bennett + Tricrômico de Mallory (HmbM) (Outubro 1998)

Novamente a combinação da Hematoxilina de Mayer-Bennett com outro corante mostrou-se melhor que a Hematoxilina de Harris, porém sem o azulamento ideal esperado para a hematoxilina. Mais uma vez o corante de Mallory não reagiu exibindo o azul da solução B, principalmente na mesoglêia.

Hematoxilina de Mayer-Bennett + Tricrômico de Gomori (HmbG) (Novembro 1998)

Esta combinação foi utilizada para se tentar substituir o corante de Mallory, porém o resultado desta combinação foi pior que os demais, permanecendo apenas uma coloração avermelhada em todo o corte, com pequenas diferenças de tonalidade.

Refixação com Bouin e Zamboni (Novembro 1998)

Em razão dos resultados pouco satisfatórios, optou-se por utilizar-se materiais refixados em outros fixadores (Bouin e Zamboni).

Para materiais refixados em Bouin e Zamboni foram utilizadas as combinações HaE, HaM, MmbE e HmbM. Os resultados destas combinações fixador-corantes foram inferiores às combinações destes corantes com materiais refixados em SUSa.

Hematoxilina de Weigert + Eosina-Floxina (HwE) (Dezembro-Janeiro 1998-9)

Com a chegada de um novo lote de reagentes, foi preparada uma solução da Hematoxilina de Weigert, que apresentou o resultado esperado em relação ao azulamento da hematoxilina; que em combinação com a eosina-floxina, resultou em lâminas de boa qualidade de coloração.

Hematoxilina de Weigert + Tricrômico de Mallory (HwM) (Dezembro-Janeiro 1998-9)

Esta última combinação mostrou-se a melhor em comparação com as demais testadas. Apesar do resultado esperado para o corante de Mallory não ser o ideal (o esperado seria a mesoglêia apresentar uma coloração azul celeste; o obtido foi uma coloração rosada), a definição das tonalidades da combinação foi a mais próxima do esperado em comparação com outros materiais analisados, ou seja, a qualificação dos elementos basófilos e acidófilos na sequência de maturação dos oócitos.

Errata

Dissertação de Mestrado: Gametogênese e desenvolvimento embrionário de *Nausithoe aurea* (Scyphozoa, Coronatae) do Canal de São Sebastião - SP. André C. Morandini (13/09/1999)

Página	Onde se lê	Leia-se
i, 7º parágrafo	<u>Ao</u> Profs. ...	Aos Profs. ...
ii	<i>Nausithoe aurea</i> <u>Silveria</u> ...	<i>Nausithoe aurea</i> Silveira ...
ii	...é uam espécie <u>metagenática</u> ...	...é uma espécie metagenética ...
ii	... geral das gônadas <u>assemalha</u> -se ...	... geral das gônadas assemelha -se ...
iv	1.1 <u>Caracteísticas</u> ...	1.1 Características ...
4	Os pedálios de <u>Coronate</u> ...	Os pedálios de Coronatae ...
5, Tabela 1	Nausithoidae <u>Claus 1879</u>	Nausithoidae Claus, 1879
8, 1º parágrafo	... que <u>apresentam</u> ...	... que apresentem ...
8, 3º parágrafo	... sendo <u>os</u> outros ...	... sendo que os outros ...
12	De acordo com <u>o autor</u> , ...	De acordo com Eckelbarger (1994) , ...
12	... a origem <u>gatrodérmica</u> ...	... a origem gastrodérmica ...
14	... <u>extendendo-se</u> em ...	... estendendo-se em...
15, 2º parágrafo	...em relação <u>a</u> evolução...	...em relação à evolução...
17, 1º parágrafo	...quanto <u>a</u> sua anatomia.	...quanto à sua anatomia.
23, 1º parágrafo	... nos <u>ítems</u> ...	... nos itens ...
24	<u>MZSP</u>	MZUSP
39	..."abertura" que <u>esta</u> ...	..."abertura" que está ...
42 (legenda da figura)	3 <u>tentáculo</u>	3 tentáculos
43 (legenda da figura)	3 <u>tentáculo</u>	3 tentáculos
44 (legenda tabela II)		incluir - = medição não possível retirar O = oócito liberado incluir cif = planulóide que assentou originando cifístoma incluir em 8.viii.97
44 (legenda tabs III-X)		observações não realizadas
45 e 46		
52, 2º parágrafo	...média = <u>77</u> oócitos ...	... média = 11 oócitos ...
52, 2º parágrafo	...média = <u>165</u> oócitos ...	... média = 8 oócitos ...
52, 2º parágrafo	...média = <u>140</u> oócitos ...	... média = 8 oócitos ...
52, 2º parágrafo	...média = <u>58</u> oócitos ...	... média = 6 oócitos ...
55	... de <u>13até</u> ...	... de 13 até ...
59, 2º parágrafo	...164-208 µm...	...164-208 µm (n = 50)...
63	<u>Nauithoe</u>	Nausithoe

Página	Onde se lê	Leia-se
74 (legenda fig.29)		incluir Onde : CGV = cavidade gastrovascular; E = epiderme; Ex = exumbrela; Ez = espermatozóides; F =

76
76 (legenda fig.30)

...coradas...

77 (legenda fig.33)
78
86, 1º parágrafo
87, Figura 41
91, 1º parágrafo
92, 2º parágrafo
94

...Cez = ...
... e revestindo ...
... pequenas células...
Fotmicrografia ...
Silveria ...
... que acreditávasse ...
... determinados para Linuche
unguiculata e os outros 3 coronados
considerados.

96
97, 1º parágrafo
101
101
101
103, 4º parágrafo
104
111
113
116 (filamento)
116 (musculatura)
122
122
125
127 (Neves)
128
129
129
130

... onde supõem-se haja...
Sendo que o trabalho ...
...apud Berril ...
Chrysaora Quinquecirrha
Cyanea capilatta
... adjacente a ...
... das células nestes...
...coronal e a musculatura...
... brasileira. Bem como, servir ...
... (facélas)...
...musculatura esta ...
Haeckel ... Das system der medusen.
Journal of Morphology
Maas ... Die medusen.
... (Verril, 1902)...
Silveira ... 1998a.. Unknown asexual
reproductive mechanisms in
...Coronatae): planuloid ...
Stiasny...1940. Die scyphomedusen.
Vanhöffen ... auf dem dampfer ...
Wietrzykowski, 1912. Développement
des Lucernaires.

folículo testicular; G = gastroderme; M = mesogléia; Mu = musculatura; S = subumbrela; SC = sulco coronal; SG = seio genital.

... corada ...

incluir **Onde:** Ec = espermátócito; Eg = espermátogônia; Et = espermátide; Ez = espermatozóide; G = gastroderme; M = mesogléia
... **CEz** = ...
... e reveste ...
... **"pequenas células"** ...
Fotomicrografia ...
Silveira ...
... que acreditava-se ...
... determinados para **os 3 coronados de águas profundas** considerados.

... onde supõe-se haja...
O trabalho ...
...apud Berrill...
Chrysaora quinquecirrha
Cyanea capillata
... adjacente à ...
... das células nestes...
...coronal e à musculatura...
... **brasileira, bem como**, servir ...
... (**facelas**)...
...musculatura **está** ...
Haeckel ... Das **System der Medusen.**
Journal of Morphology (não sublinhado)
Maas ... Die **Medusen.**
... (**Verrill**, 1902)...
Silveira ... 1998a.. **Asexual reproduction**
in ...Coronatae) by planuloid ...
Stiasny ...1940. Die **Scyphomedusen.**
Vanhöffen ... auf dem **Dampfer** ...
Wietrzykowski, 1912. **Recherches sur le**
développement des lucernaires.