

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**TESE**

**Produção, Extração e Armazenamento do Sêmen do  
Camarão de Água Doce *Macrobrachium acanthurus***

**TIAGO VIANA DA COSTA**

**2015**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**Produção, Extração e Armazenamento do Sêmen do  
Camarão de Água Doce *Macrobrachium acanthurus***

**TIAGO VIANA DA COSTA**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Lidia Miyako Yoshii Oshiro**

*e Co-orientação da Professora*  
**Laura Susana López Greco**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutor em**  
**Ciências** no Programa de Pós-Graduação  
em Zootecnia, Área de Concentração em  
Produção Animal.

Seropédica, RJ  
Julho de 2015

639.68

C837p

T

Costa, Tiago Viana da, 1978-

Produção, extração e armazenamento do sêmen do camarão de água doce *Macrobrachium acanthurus* / Tiago Viana da Costa. - 2015.  
94 f.: il.

Orientador: Lidia Miyako Yoshii Oshiro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, 2015.

Bibliografia: f. 74-94.

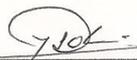
1. Camarão - Reprodução - Teses. 2. Sêmen - Teses. 3. Criopreservação de órgãos, tecidos, etc - Teses. 4. Espermatogênese em animais - Teses. I. Oshiro, Lidia Miyako Yoshii, 1955- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

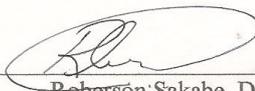
TIAGO VIANA DA COSTA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**  
no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de Concentração em Produção  
Animal.

TESE APROVADA EM 08/07/2015



\_\_\_\_\_  
Lídia Miyako Yoshii Oshiro. Dr<sup>a</sup>. UFRRJ  
(Orientadora)



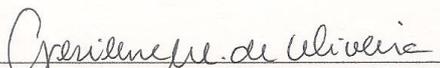
\_\_\_\_\_  
Roberson Sakabe. Dr. UFF



\_\_\_\_\_  
Alejandra Fillipo Gonzalez Neves dos Santos. Dr<sup>a</sup>. UFF



\_\_\_\_\_  
Marco Roberto Bourg de Mello. Dr. UFRRJ



\_\_\_\_\_  
Gesilene Mendonça de Oliveira. Dr<sup>a</sup>. UFRRJ



## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer especialmente a Deus pela oportunidade de mais esta encarnação e aos meus pais, Paulo Sérgio e Sônia Suange por me proporcionarem horas de carinho e dedicação; a minha irmã Paula Costa e aos meus sobrinhos Lucas Blaut e Douglas Sayão pelas horas de descontração no convívio familiar.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, que se tornou ao longo destes anos (graduação, mestrado e doutorado) a minha segunda casa, sendo bem recebido em todos os departamentos e setores pelo qual passei.

A Dra. Lidia Oshiro por acreditar em meu trabalho desde as difíceis épocas do mestrado e que agora no doutorado sempre apoiou e confiou em minhas decisões.

A Dra. Laura López Greco, que mesmo a distância me orientou com competência e confiou em meu desempenho e projeto, apesar do pouco tempo de contato em Buenos Aires.

Ao Dr. Nivaldo Sant'ana (IZ) e as Dras. Karina Keuneck (IB), Elisa Modesto (IZ) e Gesilene Oliveira (IT) pela participação e contribuição na banca de qualificação.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, que financiou este projeto mediante aprovação da bolsa de doutorado (Proc. 2801/2011).

A CAPES pelo financiamento da bolsa de doutorado sanduíche no Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C./B.C.S./México (Proc. BEX 4919/14-9).

Ao Ibama pela licença concedida para as coletas animais (14.425-1).

A Universidade Federal do Amazonas, instituição a qual tenho enorme respeito e satisfação de ser servidor público e aos meus colegas do Instituto de Ciências Sociais, Educação e Zootecnia, sediado em Parintins/AM, que me deram a oportunidade de hoje estar aqui.

A Dra. Andrea Bambozzi que me passou sua experiência na área de criopreservação para que eu pudesse dar meus primeiros passos.

A Dra. Luciana Mattos que me auxiliou nas análises estatísticas e que sempre foi uma amiga desde o mestrado.

Aos colegas de trabalho e amigos Dra. Michelle Fugimura, Felipe Nolasco, Dna. Cristiane, Sr. Josequias e Sr. Casemiro pelas horas de conversa, trocas de ideias e por estarem sempre à disposição para uma ajuda. Felipe, não esquecerei as horas debaixo do sol coletando camarões!!!

As minhas irmãs M.Sc. Helaine Flor e Emanuela Melo, pelas horas de dedicação ao meu projeto, auxiliando nas coletas de dados e contribuindo com informações e questionamentos relevantes para o crescimento do aprendizado; e pelas horas intermináveis ao telefone, seja no desespero ou na descontração. Serei eternamente (“a vida toda” né Manu!?) grato a vocês.

Aos amigos ausentes (encarnados e desencarnados), que mesmo a distância mandaram vibrações positivas durante esta longa jornada.

“Agradecer é um gesto de humildade e um ato que muitas vezes acaba sendo muito pequeno por tantas maravilhas que recebemos”.

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”  
(Benjamin Disraeli)

## RESUMO GERAL

COSTA, Tiago Viana da. **Produção, extração e armazenamento do sêmen do camarão de água doce *Macrobrachium acanthurus***. 2015. 94p. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica/RJ/Brasil, 2015.

*Macrobrachium acanthurus* ocorre em todo continente americano, ocupa rios de água doce e se reproduz próximo à foz, em virtude da dependência da salinidade para reprodução. É uma espécie apreciada pelas populações tradicionais, que através de práticas extrativistas o capturam em suas diversas fases do desenvolvimento. Este camarão apresenta dimorfismo sexual, sendo os machos geralmente maiores que as fêmeas. Os espermatozoides desta espécie são produzidos nos testículos e recebem substâncias nutritivas ao longo do vaso deferente, até serem empacotados em um espermatóforo, que pode ser extraído diretamente da ampola terminal. O processo de criopreservação de espécies nativas, seja para resguardar o patrimônio genético ou induzir a uma maior produção animal pelo processo de inseminação artificial, têm sido utilizado em diversos organismos aquáticos. Em camarões, no entanto, esta biotecnologia não tem sido empregada com sucesso, sendo a maioria delas aplicadas a espécies marinhas. Desta forma, este trabalho teve como objetivo iniciar os estudos com esta espécie nativa e ao contrário de outras pesquisas, não desenvolver um protocolo de congelamento, mas viabilizar práticas para que se alcancem num futuro o sucesso obtido em outros organismos de cultivo. Para tanto foram desenvolvidos três estudos, sendo o primeiro a identificação da melhor voltagem (6,0 Volts), que possibilitou a extração do espermatóforo, sem causar danos ao material seminal e ao animal, bem como o tamanho (18,0 mm de comprimento de cefalotórax) e peso (5,0 g de peso vivo) para contribuição máxima de produção espermática. O segundo estudo foi à determinação de uma dieta, que estimulasse maior produção espermática, sem comprometer a qualidade do espermatóforo para a criopreservação. Para as dietas testadas, um mix entre o alimento fresco, composto por músculo de pescado e lula, e um alimento seco, totalizando 30% de proteína bruta, foi o recomendado, justificado pelo baixo impacto proporcionado na constituição do espermatóforo, entretanto necessitando de mais pesquisas futuras. O terceiro experimento foi dividido em três partes, sendo realizado um teste de toxicidade, onde o metanol 10% e o glicerol 10 e 20%, em um tempo de equilíbrio de 10 minutos apresentaram-se como os menos tóxicos ao material seminal. Na segunda parte foram utilizados quatro curvas de congelamento; duas foram realizadas com equipamento comercial (automatizado) e outras duas em sistema convencional de congelamento, obtendo-se o melhor resultado (21,83% de sobrevivência) no sistema convencional, com o uso de glicerol 10%. Em todos os dois sistemas houve 100% de mortalidade, quando o metanol 10% foi utilizado como crioprotetor. A terceira parte foi composta de um simples teste de sobrevivência espermática em água destilada por 10 dias, estando o material armazenado em refrigerador a 5°C. Os resultados apontaram que por até três dias os espermatozoides se mantêm viáveis e podem ser utilizados num processo de fecundação.

**Palavras-chave:** Carideos, Crioprotetores, Nutrição, Reprodução, Sobrevivência espermática.

## RESUMEN GENERAL

COSTA, Tiago Viana da. **Producción, extracción y mantenimiento del semen del langostino *Macrobrachium acanthurus***. 2015. 94p. Tesis (Doctorado en Ciencias). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica/RJ/Brasil, 2015.

Presente en todo continente americano, en los ríos de agua dulce y reproduciéndose cerca de las desembocaduras, en virtud de su dependencia de la salinidad para la reproducción, el langostino *Macrobrachium acanthurus* es consumido por poblaciones tradicionales, que mediante prácticas extractivas lo capturan en sus diferentes fases del desarrollo. Este langostino presenta dimorfismo sexual, siendo los machos mayores que las hembras. En éstos, los espermatozoides son producidos en los testículos y reciben sustancias nutricionales a lo largo del vaso deferente donde son empaquetados en un espermatóforo que puede ser extraído directamente de la ampolla terminal. El proceso de criopreservación de especies nativas, tanto para proteger el patrimonio genético o estimular una mayor producción animal mediante los procesos de inseminación artificial, ha sido utilizado en varios organismos acuáticos. En camarones, esta biotecnología no ha sido empleada con suceso hasta ahora, aunque la mayoría ha sido empleada a especies marinas. De esta forma, este trabajo tuvo como objetivo iniciar los estudios en esta especie nativa y diferente de otras investigaciones, no desarrollar un protocolo de congelamiento, sino viabilizar prácticas para que en el futuro se logre el suceso obtenido en otros organismos de cultivo. Para esto, se realizaron tres estudios, donde en el primero se identificó la mejor voltaje (6,0 Voltios) que permitió la extracción del espermatóforo sin causar daños ni al semen y ni a los animales, así como la talla (18,0 mm de largo del caparazón) y peso (5,0 g peso vivo) con que estos animales podrían contribuir con producción espermática máxima. El segundo estudio se realizó para obtener una dieta que mejorase la producción de espermatozoides, sin comprometer su calidad para la criopreservación. De las dietas probadas, una mezcla entre alimento fresco, compuesto de músculo de pescado y calamar, y un alimento seco, con un total de 30% de proteína cruda, fue el recomendado, justificado por el bajo impacto proporcionado en la constitución del espermatóforo; sin embargo se necesitan más investigaciones en esto aspecto. El tercero experimento fue dividido en tres partes, habiéndose realizado una prueba de toxicidad, donde el metanol 10% y el glicerol 10 y 20% con un tiempo de equilibrio de 10 minutos se presentaron como los menos tóxicos para el material seminal, siendo utilizados en cuatro pruebas de congelamiento; dos pruebas fueron hechas en un equipo comercial (automatizado) y otras dos con un método convencional de congelamiento. El mejor resultado (21,83% de supervivencia) fue obtenido con el método convencional, con glicerol 10%. En la tercera parte se realizó una prueba de supervivencia espermática con el uso de agua destilada por 10 días, siendo el material refrigerado a 5°C. Los resultados revelaron que los espermatozoides se mantienen viables hasta tres días, pudiendo utilizarse para la fecundación.

**Palabras-clave:** Carideos, Crioprotectores, Nutrición, Reproducción, Supervivencia espermática.

## GENERAL ABSTRACT

COSTA, Tiago Viana da. **Production, extraction and storage of freshwater shrimp *Macrobrachium acanthurus* semen.** 2015. 94p. Thesis (Doctor of Science). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica/RJ/Brasil, 2015.

Occurring throughout the American continent, occupying freshwater rivers and reproducing near his mouth, because of the dependence of salinity for reproduction, *Macrobrachium acanthurus* has been appreciated by the traditional populations of these regions, through the capture extractive practices in their various stages of development. This shrimp was sexually dimorphic, with the males generally larger than females. In these, the spermatozoa are produced in the testicles and receive nutrients through the vas deferens to be packaged in Spermatophores that can be extracted directly from the light bulb terminal. The process of cryopreservation of native species, is to protect the genetic heritage or induce increased animal production by artificial insemination procedures, has been used in various aquatic organisms. In shrimp, however, this biotechnology has not been successfully employed, most of them being applied to marine species. Thus, this work had as objective begin studies with this native species and unlike other research, not develop a freezing protocol, but enable practices to achieving a future success obtained in other farming organisms. For this, three studies were developed, and the first identifying themselves as best voltage (6.0 volts) that where possible the extraction of spermatophore, without causing damage to the seminal material and the animal, as well as the size (18.0 mm carapace length) and weight (5.0 g body weight) that these animals could be contributing to the max with sperm production. The second study was to determine a diet that best stimulates a higher sperm production, without however, compromising the spermatophore qualities for cryopreservation. For the diets tested, a mix between fresh food, made up of fish and squid muscle, and a dry food, totaling 30% crude protein, was recommended, justified by the low impact provided in the constitution of spermatophore and requiring future research. The third experiment was divided into three parts, a toxicity test conducted where the 10% methanol and 10 and 20% glycerol in a 10 min equilibration time is presented as the least toxic to the seminal material, and then used in four freezing curves; two were conducted in commercial equipment (automated) and two in conventional freezing system. The best result (21.83% survival) was the conventional system, with the use of 10% glycerol. In all the two systems there was 100% mortality when 10% methanol was used as a cryoprotectant. The third part was composed of a single sperm survival test in distilled water for 10 days, with the material stored in a refrigerator at 5°C. The results showed that up to three days the sperm remains viable and can be used for artificial fertilization.

**Keywords:** Caridea, Cryoprotectants, Nutrition, Reproduction, Sperm survival.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO GERAL</b>	
<b>RESUMEN GENERAL</b>	
<b>GENERAL ABSTRACT</b>	
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>2</b>
1 Bioecologia do Camarão <i>Macrobrachium acanthurus</i> .....	2
2 Espermatogênese em <i>Macrobrachium</i> spp. ....	3
3 Crioprotetores e seus Mecanismos de Ação .....	7
4 Criopreservação de Invertebrados .....	12
<b>CAPÍTULO I. DETERMINAÇÃO DE VOLTAGEM E DO TAMANHO DE</b> <b><i>Macrobrachium acanthurus</i> PARA A EXTRAÇÃO DO</b> <b>ESPERMATÓFORO</b> .....	<b>19</b>
<b>RESUMO</b> .....	20
<b>RESUMEN</b> .....	21
<b>ABSTRACT</b> .....	22
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
2.1 Avaliação da Voltagem .....	25
2.2 Efeito do Comprimento e Peso sobre a Produção de Espermatóforos .....	27
<b>3. RESULTADOS</b> .....	29
3.1 Avaliação da Voltagem .....	29
3.2 Efeito do Comprimento e Peso sobre a Produção de espermatóforos .....	30
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	34
4.1 Avaliação da Voltagem .....	34
4.2 Efeito do Comprimento e Peso sobre a Produção de Espermatóforos .....	36
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	38
<b>CAPÍTULO II. EFEITO DE TRÊS DIETAS SOBRE A PRODUÇÃO ESPERMÁTICA</b> <b>EM <i>Macrobrachium acanthurus</i></b> .....	<b>39</b>
<b>RESUMO</b> .....	40
<b>RESUMEN</b> .....	41
<b>ABSTRACT</b> .....	42
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	43
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	45
<b>3. RESULTADOS</b> .....	47
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	49
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	54

<b>CAPÍTULO III. TESTE DE TOXICIDADE, METODOLOGIAS DE CONGELAMENTO E REFRIGERAÇÃO EM SÊMEN DE <i>Macrobrachium acanthurus</i></b>	<b>55</b>
<b>RESUMO</b>	56
<b>RESUMEN</b>	57
<b>ABSTRACT</b>	58
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	59
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	61
2.1 Teste de Toxicidade	61
2.2 Testes de Criopreservação e Refrigeração	62
<b>3. RESULTADOS</b>	65
3.1 Teste de Toxicidade	65
3.2 Testes de Criopreservação e Refrigeração	65
<b>4. DISCUSSÃO</b>	68
<b>5. CONCLUSÃO</b>	72
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b>	73
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	74



## INTRODUÇÃO GERAL

A aplicação crescente de biotécnicas tem gerado a cada ano um aporte nas produções animais, principalmente pelo uso do melhoramento genético, seja pela implantação de embriões, inseminação artificial visando hibridização e o aumento da quantidade de proles ou através dos processos de criopreservação, que tem por objetivo potencializar um estoque de material genético para usos futuros, auxiliando na manutenção do patrimônio genômico de uma espécie.

Entre os distintos grupos de organismos aquáticos (moluscos, crustáceos e peixes), o uso da criopreservação de gametas ou formas jovens já é uma realidade, sendo aplicado nos diversos campos do conhecimento científico. Entretanto, o uso desta técnica em crustáceos não conquistou o mercado por falta de tecnologias adequadas que descrevessem um protocolo considerado ideal para os gametas destes animais, pois a cada espécie, aplica-se um crioprotetor, seja intracelular ou extracelular, com diferentes combinações e concentrações.

É sabido que independente das concentrações, os crioprotetores são tóxicos a todas as células, sendo, entretanto necessários para a sobrevivência celular a baixas temperaturas, impedindo assim as crioinjúrias provocadas pelo frio durante o processo de desidratação. Assim, o uso destas substâncias, atrelado ao processo de congelamento, expõe a célula a um tênue limiar entre a morte e a preservação da vida.

*Macrobrachium acanthurus* é uma espécie de camarão de água doce que se encontra entre as diversas regiões estuarinas dos rios caudalosos e riachos da parte Atlântica do continente Americano, distribuindo-se dos EUA ao sul do Brasil. Desta forma, o consumo desta espécie pelas populações ribeirinhas, de baixa renda e que sobrevivem da pesca extrativista tem sido utilizado para subsistência. Além deste fator, as constantes ações antrópicas nas áreas costeiras tem elevado a redução de áreas para reprodução natural destes animais.

Sendo um camarão considerado com potencial para o cultivo e visando a preservação desta espécie em ambiente natural, este trabalho teve como objetivo desenvolver técnicas que viabilizem a criopreservação do gameta masculino, sem a definição de um protocolo, mas estudar características favoráveis que levem ao desenvolvimento deste. Para tanto, foram traçados os objetivos específicos abaixo, apresentados em três distintos capítulos:

**Capítulo I:** Determinar a voltagem ideal para extração do material seminal do camarão e determinar o tamanho com que o macho contribui plenamente para o potencial reprodutivo da espécie.

**Capítulo II:** Determinar uma dieta que viabilize o aumento da produtividade espermática e correlacionar seus efeitos com o processo de criopreservação.

**Capítulo III:** Determinar a toxicidade de crioprotetores para o espermatóforo de *M. acanthurus*; estudar a melhor forma de congelamento mediante aplicação de dois sistemas, um automatizado e um convencional e determinar o tempo de viabilidade dos espermatozoides, quando submetidos ao processo de refrigeração.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1 Bioecologia do Camarão *Macrobrachium acanthurus*

Os Decapoda representam uma das ordens mais bem sucedidas de crustáceos vivos, sendo constituída por mais de 14.756 espécies descritas, distribuídas em mais de 2.725 gêneros com ampla distribuição mundial (DE GRAVE et al., 2008, 2009), sendo encontrados em águas costeiras, continentais doces ou salobras, como rio, lagos e zonas estuarinas (VALENTI, 1985).

De acordo com Gastelú e Oliveira (2004), os decápodos de água doce representam aproximadamente 10% do total de crustáceos de todo o mundo e as mudanças ocorridas por variações sazonais e efeitos antropogênicos têm apresentado maior repercussão nestas espécies, que naquelas que vivem em ambiente marinho. Segundo Anzuategui e Valverde (1998), em todo o mundo, existem cerca de 2.000 espécies de camarão, que vivem em todos os tipos de água doce e salgada, fria ou tropical.

A maioria das espécies de camarões de água doce que possui interesse comercial pertence ao gênero *Macrobrachium* Bate, 1868, distribuídos em regiões tropicais e subtropicais do mundo (JALIHAL et al., 1993), não sendo nativos apenas na Europa e Antártica (HOLTHUIS e NG, 2010). São conhecidas aproximadamente 210 espécies deste gênero em todo o mundo (SHORT, 2004), das quais 55 são registrados nas Américas e destes, 18 no Brasil (MELO, 2003; MOSSOLIN et al., 2010). Entre as espécies de *Macrobrachium* conhecidas no Brasil, com potencial para exploração econômica estão o *Macrobrachium carcinus* (Linnaeus, 1758), *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) e o *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Figura 1A-C).



**Figura 1.** (A) *Macrobrachium carcinus*, (B) *M. acanthurus* e (C) *M. amazonicum*.

*Macrobrachium acanthurus* pertence à Família Palaemonidae e encontra-se distribuído em todo o continente americano e nas Antilhas, e no Brasil do Pará ao Rio Grande do Sul (FONSECA, 1995; CAMACHO et al., 1997; COELHO e RAMOS-PORTO, 1998; TORATI et al., 2011), sendo denominados popularmente como camarão “pitu” ou “camarão canela”. Esta espécie habita rios e ecossistemas costeiros, podendo ser encontrado sob pedras e entre vegetações submersas das margens. Além de sua importância para o consumo humano, estes macrocrustáceos representam importantes presas para a maioria dos organismos carnívoros, que ocupam os sistemas aquáticos, seja no estágio larval ou na forma adulta (TEIXEIRA e SÁ, 1998).

É uma espécie que possui potencial para o cultivo e de considerável importância econômica, principalmente para as populações que o exploram de forma artesanal (VALENTI et al., 1989). De hábitos alimentares onívoros, alimenta-se da vegetação dos rios, de pequenos invertebrados e detritos (QUIJADA e PEREIRA, 1990; SOUZA e MOULTON, 2005). De

acordo com Albertoni et al. (2003) a presença de grandes quantidades de detritos na análise do conteúdo estomacal de *M. acanthurus*, sugere que há manipulação do alimento antes da ingestão, facilitando a digestão de muitos itens pela separação de suas partes mais difíceis.

*Macrobrachium acanthurus* é uma espécie dióica, apresentando dimorfismo sexual caracterizado pela presença do apêndice masculino no segundo par de pleópodos e as fêmeas por sua ausência. Segundo Albertoni et al. (2002a) é uma das espécies consideradas de grande porte, alcançando a maturidade sexual no primeiro ano de vida, variando de 33 a 180 mm nos machos e de 26 a 96 mm nas fêmeas, podendo carregar numerosos ovos pequenos (FONSECA, 1995). Segundo Valenti (1987) em camarões de água doce do gênero *Macrobrachium*, os machos adultos atingem tamanhos, em geral, maiores que as fêmeas, apresentam o cefalotórax e o segundo quelípodo proporcionalmente mais desenvolvidos.

Os fatores que determinam o número de ovos carregados pelas fêmeas em cada espécie são o porte, o espaço disponível para a organização da câmara incubadora, a capacidade da gônada e o tamanho dos ovos (HINSCH, 1992; MÜLLER et al., 1992, 1996). Valenti et al. (1989) encontraram para fêmeas do Rio Ribeira de Iguape/SP, fecundidade variando entre 740 a 17.769 ovos, sendo superiores aos 5.670 e 7.034 ovos reportados por Müller et al. (1992) e Tamburus et al. (2012) para fêmeas provenientes do Rio Capivari/SC e costa Norte do estado de São Paulo, respectivamente, ressaltando que as espécies mais fecundas apresentam ovos pequenos e muitos estágios larvais, e corroborando com aqueles encontrados por Albertoni et al. (2002a) em Macaé/RJ (1.054 a 17.093 ovos).

De acordo com Choudhury (1969), o desenvolvimento larval planctônico dessa espécie compreende dez estágios, ilustrado em seu trabalho com as principais estruturas morfológicas, necessitando de um ambiente salobro para o desenvolvimento dos primeiros estágios de zoea, sendo citado por Moreira et al. (1986) uma tolerância entre 14 e 20 ppt, chegando a um máximo de 25 ppt segundo Brailovsky e Galera (1997). Quadros et al. (2004) relataram os dez estágios larvais em uma salinidade de 16 ppt, com a ocorrência das pós-larvas no 39<sup>a</sup> dia do experimento. Entretanto, os animais adultos são frequentemente encontrados em locais com baixa salinidade, estando mais adaptados a ambientes dulcícolas (TEIXEIRA e SÁ, 1998; MÜLLER et al., 1999; ALBERTONI et al., 2002a).

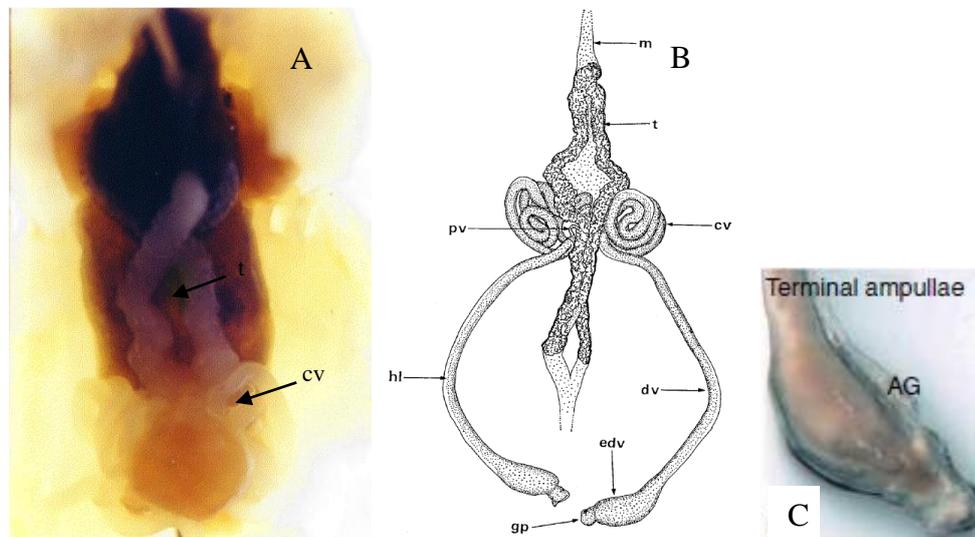
Segundo Coelho et al. (1982) a maior parte dos animais comercializados provêm da pesca, em ambientes naturais, o que tem contribuído para uma drástica redução dos estoques, bem como as alterações antrópicas, tais como, a poluição, os aterros e as construções de barragens, que impedem as migrações feitas pela maioria das espécies durante o período reprodutivo.

Carvalho (1980) menciona que o cultivo de crustáceos depende basicamente da manutenção de um estoque de reprodutores que possa assegurar a continuidade da produção larval durante todo o ano. Ocorrendo em quase todo o território nacional, o cultivo de *M. acanthurus* não oferece riscos à natureza por escape de viveiros de aquicultura, como observado nas produções de espécies exóticas, apresentando-se como espécie com grande potencial. Desta forma, estudos que gerem informações para subsidiar técnicas de produção são necessários, seja através dos sistemas de cultivo comercial, ou através de exploração racional dos estoques naturais, evitando-se os riscos do seu esgotamento.

## 2 Espermatogênese em *Macrobrachium* spp.

O aparelho reprodutor masculino de algumas espécies do gênero *Macrobrachium* relatam a presença de testículos, vasos deferentes, glândulas androgênicas e poros genitais, sendo que todas estas estruturas apresentam-se aos pares (Figura 2) (CHOW et al., 1982;

SAGI et al., 1988; VERDI e DELGADO, 1998; PAPA, 2003, 2007; POLJAROEN et al., 2010).



**Figura 2.** Sistema reprodutor masculino de *M. rosenbergii*. A: fotografia com aumento de 2x; B: esquema completo do sistema reprodutor. cv = vaso deferente enovelado, dv = vaso deferente distal, edv = alargamento do vaso deferente distal, gp = poro genital, hl = linha hialina, m = mesentério, pv = vaso deferente proximal, t = testículos e C: ampola terminal com a glândula androgênica (AG).

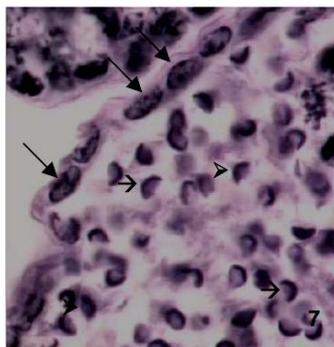
Figuras reproduzidas de (A) Goldberg (1998), (B) Chow et al. (1982) e (C) Ma et al. (2010).

Quanto à morfologia do aparelho reprodutor masculino do camarão de água doce *Macrobrachium acanthurus*, Carvalho (1980) descreveu ser composto por testículos, vasos deferentes, saco espermatofórico (ampola terminal) e glândulas androgênicas. Nesta espécie os testículos são pares, simétricos, alongados e unidos na região mediana. Eles estão localizados no cefalotórax, dispostos sobre o hepatopâncreas e o coração. Microscopicamente os testículos de *M. acanthurus* são providos de túbulos seminíferos enovelados e estão revestidos por uma cápsula de tecido conjuntivo. Esta cápsula é composta por uma camada externa fibrosa e outra interna frouxa. Os túbulos seminíferos, em corte transversal, apresentam-se circulares, formados por uma parede na qual se distingue o epitélio germinativo. O mesmo foi observado por Poljaroen et al. (2010) em *M. rosenbergii* De Man, 1879, caracterizando os testículos destes animais em lobulares e tubulares, a níveis macroscópico e histológico, respectivamente.

Os testículos abrigam as células germinativas, onde serão realizadas as etapas da espermatogênese. Estas células desenvolvem-se para dar origem aos gametas (espermatozoides). De acordo com Mañanós et al. (2008), o processo de espermatogênese pode ser dividido em três fases: (1) a proliferação mitótica da espermatogônia, (2) a divisão meiótica dos espermatócitos e (3) a transformação das espermatídes haplóides em espermatozoides (espermiogênese). Antes do início do desenvolvimento gonadal, os testículos imaturos possuem espermatogônias (células primordiais), que proliferam por divisão mitótica em um processo de autorenovação, aumentando a quantidade de células primordiais nos testículos. Em um determinado momento, estas células entram em um processo de espermatogênese e produzem as espermatogônias (Figura 3) em uma fase denominada fase mitótica de proliferação da espermatogônia (fase 1). Durante esta divisão, a citocinese (divisão citoplasmática) está incompleta e as células se mantêm ligadas, denominando-se

espermatozoides. O grupo que se forma de células mães, são clones da espermatogônia, bem como das células primordiais. Cada espermatozoides é envolvido por células de Sertoli, que mantém os diferentes clones separados um do outro. Durante esta fase de proliferação mitótica, a espermatogônia passa por uma divisão lenta (espermatogônia A) e somente depois por uma divisão rápida (espermatogônia B). A última divisão mitótica dará origem aos espermatozoides primários, que entrarão em um processo de meiose (fase 2). Durante esta fase, os espermatozoides primários sofrem uma primeira meiose, que envolve o processo de duplicação do DNA e recombinação das informações genéticas, levando a formação do espermatozoides secundário (estas células apresentam núcleo em meia lua e com a cromatina condensada em grumos). Esta célula sofrerá uma rápida segunda divisão meiótica, sem duplicação do DNA, levando a formação das células haplóides, as espermatóides.

As espermatóides (células que estão geralmente situadas na porção central dos lóbulos testiculares e apresentam núcleo com cromatina condensada em grandes grumos e início da polarização no formato de “U”, constituindo o aspecto de uma taça, onde se inicia a formação de uma provável peça intermediária e espinho do espermatozoides) entram no processo de espermiogênese (fase 3), onde cada célula haplóide se diferencia em um espermatozoides. Uma vez a espermiogênese se completa, as paredes das células de Sertoli se rompem e os espermatozoides passam ao vaso deferente (Figura 4A) (MAÑANÓS et al., 2008; PAPA, 2003; POLJAROEN et al., 2010).

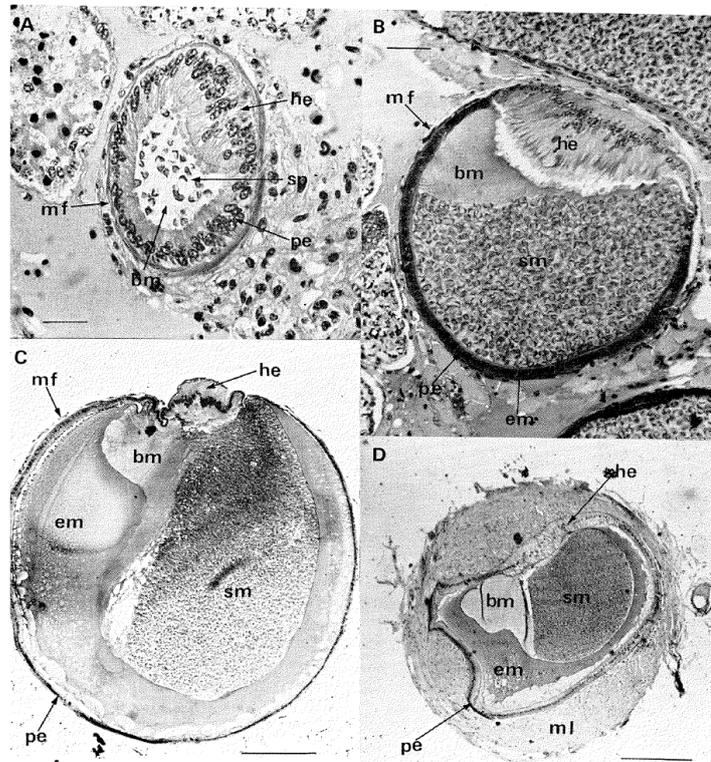


**Figura 3.** Testículo de *M. amazonicum* evidenciando espermatogônias primárias (setas maiores), espermatóides (setas menores) e espermatozoides (símbolo). Aumento: 500x. (PAPA, 2003).

Segundo Chow et al. (1982), o epitélio do vaso deferente (Figura 4) é glandular e formado por células colunares. De acordo com Díaz et al. (2002a), o epitélio dos ductos deferentes apresentam várias funções tais como, o transporte e manutenção de um ambiente propício para os gametas, e a produção de uma capa protetora, formando o espermatóforo (Figura 5). A porção proximal possui uma grande quantidade de espermatozoides e pouca substância gelatinosa (matriz basofílica). Na porção envelhada do vaso deferente, é observada uma forte matriz eosinófila, em adição aos espermatozoides e a matriz basofílica. Em virtude destas matrizes estarem sempre ao longo do epitélio colunar, existe uma maior probabilidade destas serem secretadas por este epitélio. Como a matriz basofílica aumenta em quantidade ao longo da porção envelhada, os espermatozoides agregam-se e formam uma massa coberta pela mesma. O limite de contato entre a massa espermática e as substâncias gelatinosas formam uma linha hialina. As porções distais e dilatadas (ampola terminal) do vaso deferente são semelhantes a anterior nas suas estruturas fundamentais. A quantidade de matriz e esperma nestas porções são semelhantes e maior na porção envelhada. A bem desenvolvida parede muscular, composta de músculos transversais e longitudinais, dilatam a porção distal (ampola

terminal – Figura 4 C-D). Estes músculos podem ser vistos durante a contração do vaso deferente e expulsão dos espermátóforos.

Segundo Díaz et al. (2002a), a estrutura do espermátóforo é bem variável entre os Decapoda, sendo compreensível uma variação de estrutura morfológica dos vasos deferentes, principalmente em sua porção terminal.

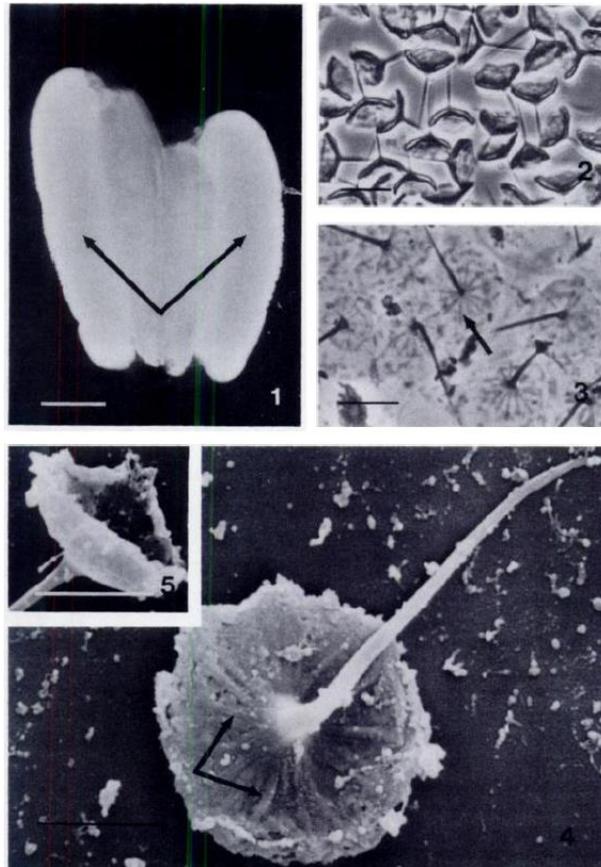


**Figura 4.** Seção transversal do vaso deferente de *M. rosenbergii*. A (30µm): porção proximal, B (50µm): porção enovelada, C (200µm): porção distal e D (400µm): porção dilatada. bm = matriz basofílica; em = matriz eosinófila; he = epitélio colunar maior; mf = fibras musculares; ml = parede muscular; pe = epitélio periférico; sm = massa espermática (CHOW et al., 1982).

O espermátóforo (Figura 5) consiste de uma matriz eosinófila, uma basofílica e um par de massa espermática aderida na matriz basofílica. Em geral, apresentam uma simetria bilateral. A matriz eosinófila é adesiva (matriz adesiva) e se adere ao tórax da fêmea e a matriz basofílica possui pouca adesividade, sendo denominada de matriz protetora (CHOW et al., 1982). Dougherty et al. (1986) e Poljaroen et al. (2010) descreveram três camadas morfológicamente distintas do espermátóforo de *M. rosenbergii*, sendo uma massa espermática lateral, uma massa mucosa medial (matriz basofílica) e uma cápsula não celular recobrendo as duas massas anteriores (matriz adesiva).

Os espermatozóides (Figura 3 e 5) são células que ocupam o centro dos lóbulos testiculares. São pequenos e imóveis, e apresentam a cabeça no formato de taça com a cromatina condensada em formato de “V”, provável peça intermediária curta e a cauda em forma de espinho (PAPA, 2003; BRAGA et al., 2013a). De acordo com Poljaroen et al. (2010), os espermatozóides maduros encontrados na ampola terminal aparecem similares aqueles dos testículos, estando apenas o núcleo mais achatado e a cromatina totalmente descondensada. Estes mesmos autores concluem que o processo de maturação espermática necessita de maiores estudos.

Okumura e Hara (2004) estudaram a correlação da estrutura celular das glândulas androgênicas (que estão associadas à camada muscular da ampola terminal – Figura 2C) na atividade espermatogênica e na diferenciação morfológica de *M. rosenbergii*. Estes autores concluíram que durante a espermatogênese, que está relacionada com o ciclo de muda, o hormônio androgênico apresenta-se em níveis constantes e tem importantes papéis na manutenção e na regulação deste processo. Estes mesmos autores também verificaram que durante a diferenciação morfológica, as glândulas androgênicas estão mais ativas nos machos do morfotipo de quela azul (BC) e que esta apresenta papel na regulação da atividade do período reprodutivo. De acordo com Sagi et al. (1997) e Okuno et al. (2002), o hormônio produzido pelas glândulas androgênicas é essencial para a espermatogênese sendo também importante no comportamento dos machos.



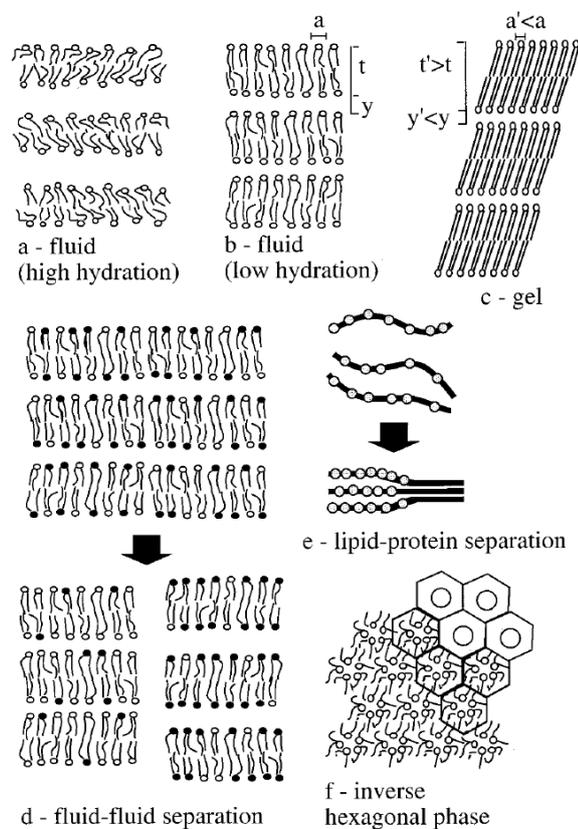
**Figura 5.** Espermatóforos e espermatozoides de *M. rosenbergii*. (1) par de espermatóforos eletroestimulados exibindo uma região translúcida medial e uma região opaca lateral (setas), onde normalmente contém os espermatozoides (1mm). (2) micrografia do esperma exibindo uma configuração com forma de “guarda-chuva” (10 $\mu$ m). (3,4) micrografia exibindo as fibrilas radiais (10 e 5 $\mu$ m). (5) forma do corpo com a projeção do espinho e a superfície convexa (LYNN e CLARK Jr., 1983).

### 3 Crioprotetores e seus Mecanismos de Ação

As membranas espermáticas encontram-se em um estado de fluidez, sendo esta característica, um pré-requisito para o desempenho de suas funções. Os principais fatores que afetam esta fluidez são a composição relativa entre fosfolipídios e colesterol e a temperatura a

qual a membrana é exposta. Os lipídios e proteínas de membrana, que permeiam em um estado de fluidez, permitem a movimentação livre dos componentes da membrana. A contínua queda de temperatura durante o congelamento, produz alterações físicas nesta, que passará do estado líquido ao de gel e as cadeias de ácidos graxos, que se encontravam aleatoriamente distribuídas, ordenam-se paralelamente, produzindo uma estrutura rígida, tornando estas áreas fracas e susceptíveis a rupturas, fusões e permeáveis a íons (Figura 6) (HAMMERSTED et al., 1990; ANGOLA, 1994).

De acordo com Robertson e Watson (1986) e Angola (1994), um efeito também importante que ocorre na membrana durante o resfriamento é o agrupamento das proteínas pela separação da fase lipídica (Figura 6), processo pelo qual a função destas proteínas termina sendo afetada, como por exemplo, os canais iônicos. Isto se deve ao fato de que a permeabilidade das membranas aumenta após o resfriamento.



**Figura 6.** Tensões produzidas pelo processo de desidratação. (a) Membrana celular hidratada; (b) Tensão produzida pela perda de água. A distância média dos lipídios  $a$  e a separação interlamelar  $y$  diminuíram, enquanto a espessura lamelar  $t$  aumentou. (c) a uma maior perda de água, aumenta o estresse lateral produzindo a transição para a fase de gel. Nesta fase,  $a' < a$ ,  $t' > t$  e  $y' < y$ . Desidratação a altas temperaturas produz esta transição. (d) os círculos sombreados representam lipídios hidratados e os não sombreados desidratados. Em alta hidratação, os dois lipídios formam uma fase mista (parte superior), mas com a desidratação eles se separam, ou seja, os lipídios com maior hidratação preferencialmente se juntam, bem como os desidratados (parte inferior). (e) As proteínas (círculo maior), grandes moléculas hidrofílicas, se interagem, formando tensões de desidratação. (f) resposta ao alto nível de desidratação, onde os lipídios podem ser submetidos a uma transição para a fase hexagonal (WOLF e BRYANT, 1999).

Crioprotetores são compostos químicos que possuem um efeito notável sobre a vida das células, irão protegê-las contra as distorções provocadas pelo congelamento e descongelamento (FAHY et al., 1990). Crioprotetores podem ser classificados em dois grupos: intracelulares (solutos orgânicos responsáveis por proteger as organelas das células durante o resfriamento) e extracelulares (macromoléculas e açúcares cujas funções são reduzir a formação de gelo, facilitar a desidratação das células e proteger a membrana celular) (NIEMANN, 1991; DENNISTON et al., 2000; BEIRÃO et al., 2006).

McLaughlin et al. (1992) relataram que, a adição dos agentes crioprotetores aumenta a proporção de água descongelada numa dada temperatura e assim diminui a concentração de eletrólitos intracelular, diminuindo o impacto dos efeitos das soluções. De acordo com Mazur et al. (1972) e Medeiros et al. (2002), o congelamento de uma célula deverá ser tão rápido quanto possível para evitar os efeitos dos crioprotetores, mas eficientemente lento para que as células possam desidratar, evitando a formação de gelo intracelular.

Se o congelamento for lento, a injúria se deve principalmente à desidratação excessiva. Nestes casos ocorrerá rompimento das membranas, concentração de solutos no citoplasma a níveis tóxicos e desnaturação de ácidos nucleicos e membranas (SANTOS, 2000). Por outro lado, se o ritmo de congelamento for rápido (redução da temperatura maior que 10-20°C/min) a água intracelular não tem tempo de sair, formando microcristais de gelo. Estes microcristais são instáveis e durante o descongelamento agrupam-se formando grandes cristais, sendo letais às células (ANGOLA, 1994).

Segundo Baudot et al. (2002), a estrutura molecular dos diferentes crioprotetores determina sua eficiência, visto que são hidrofílicos, pela presença de grupamentos amina e hidroxila em sua composição, favorecendo a formação de ligações com as moléculas de água. Essas ligações alteram a orientação das moléculas de água dos cristais de gelo, criando um ambiente menos prejudicial às células. Desta forma, um crioprotetor para ser eficiente necessita ter baixo peso molecular, boa permeabilidade de membranas, alta solubilidade em soluções aquosas e principalmente não ser tóxico (HANADA e NAGASE, 1980; KASAI, 1996). Este último autor menciona ainda que, em geral, agentes com rápida capacidade de penetração são mais favoráveis, porque o tempo de exposição ao crioprotetor antes do rápido resfriamento é curto, prevenindo assim as injúrias osmóticas.

Os crioprotetores intracelulares atuam por meio de suas propriedades coligativas, e diminuem o ponto crioscópico intracelular, de maneira que uma quantidade maior de água permanecerá no estado líquido sob baixas temperaturas, diminuindo a concentração intracelular dos solutos, propiciando um ambiente menos deletério à célula espermática durante o congelamento (WATSON, 1995). Entre aqueles crioprotetores intracelulares mais comumente utilizados para sêmen/espermatóforos de camarão estão o etilenoglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol e metanol.

Os crioprotetores extracelulares possuem alto peso molecular não podendo permear as células. De acordo com Dalimata e Graham (1997), estes crioprotetores protegem as células por meio de efeitos osmóticos, criando um meio hipertônico que induz a saída de água do meio intracelular para o extracelular, causando a desidratação do espermatozoide e posterior redução da formação de cristais de gelo intracelulares durante o congelamento. Entre os crioprotetores extracelulares mais utilizados para sêmen/espermatóforos de camarão estão a sacarose e a trealose.

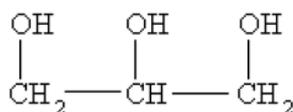
Segundo Denniston et al. (2000), o desempenho dos agentes crioprotetores intracelulares pode ser otimizado associando-os aos de ação extracelular. De acordo com Green (2005) e Digmayer (2010), a utilização de um crioprotetor extracelular permite também reduzir a concentração do crioprotetor intracelular, diminuindo assim, a toxicidade provocada por este. Benson et al. (2012) mencionam que um fator importante a se considerar é que as altas concentrações de crioprotetores demonstraram ser citotóxicas e que os testes de toxicidade

específicos para cada tipo celular podem ajudar a otimização dos protocolos de criopreservação, visto que existe uma diferença de permeabilidade de membrana entre e dentro as espécies animais (HOLT, 2000). Gwo (2000) menciona que a escolha do crioprotetor deverá ser de acordo com a espécie de crustáceo.

Abaixo seguem descritos os mecanismos de ação dos principais crioprotetores utilizados para sêmen/espermatóforo de camarão e na Tabela 1 podem ser observadas algumas espécies que usaram estas substâncias como agentes crioprotetores.

#### a) Glicerol

É um álcool incolor, com gosto adocicado, sem cheiro e muito viscoso, derivado de fontes naturais ou petroquímicas. A presença de três grupos hidroxilas na estrutura do glicerol (Figura 7) é responsável pela sua natureza higroscópica (BEATRIZ et al., 2011).



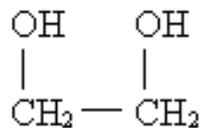
**Figura 7.** Composição química do glicerol.

O glicerol exerce um efeito extracelular de desidratação osmótica da célula, reduzindo assim o volume intracelular de água disponível para o congelamento. O efeito intracelular do glicerol, exercida pela sua capacidade de permear a membrana celular, é a diminuição da pressão osmótica promovida pela desidratação. Este fato ocorre pela substituição da água intracelular necessária para a manutenção do volume celular, interação com íons e macromoléculas, e deprimimento do ponto de congelamento da água (MEDEIROS et al., 2002).

O mecanismo exato pelo qual este crioprotetor protege as células dos danos causados pelo congelamento e descongelamento não são completamente entendidos. Entretanto, Parks e Graham (1992) e Angola (1994), mencionam que o glicerol penetra e confere proteção à membrana celular, reduzindo o número de poros e suas funções ATP-dependentes, promovendo assim a agregação protéica e a formação de blocos de lipídios. Estes mesmos autores afirmam, que apesar de seus efeitos essenciais no processo de criopreservação celular, o glicerol pode também produzir efeitos deletérios aos espermatozoides, por apresentar graus de toxicidade dependentes de sua concentração utilizada. McLaughlin et al. (1992) descrevem os efeitos tóxicos do glicerol sobre os espermatozoides, fato que ocorre provavelmente em função da interação molecular do glicerol com as membranas plasmáticas destes, alterando a fluidez pela intercalação na dupla camada lipídica, o que modifica a viscosidade citoplasmática e, dessa maneira, afeta todas as reações metabólicas (HAMMERSTEDT e GRAHAM, 1992).

#### b) Etilenoglicol

É um crioprotetor que pertence ao grupo dos alcoóis (Figura 8), assim como o glicerol, que vem sendo utilizado no congelamento de sêmen de diversas espécies animais. Possui menor peso molecular e toxicidade que o glicerol e alta permeabilidade celular (AKARASANON et al., 2004). Possui quatro pares de elétrons isolados, podendo se ligar com átomos de hidrogênio em quatro sítios e doar dois átomos de hidrogênio (KEITH, 1998); pode também realizar ligações de hidrogênio na membrana do espermatozoide (KUNDU et al., 2000).

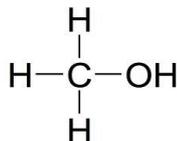


**Figura 8.** Composição química do etilenoglicol.

De acordo com Moraes et al. (1998), este crioprotetor possui capacidade de preservar o acrossomo, podendo significar uma melhor preservação de outras estruturas dos espermatozoides, como o núcleo, fundamental para que ocorra um perfeito desenvolvimento embrionário; segundo o mesmo autor, esta proteção pode ser explicada pela sua velocidade de penetração na célula, diminuindo a alta concentração de sais no interior do espermatozoide, que é nocivo à membrana espermática (HOLT et al., 1992).

c) Metanol

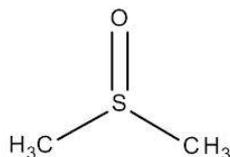
É um álcool (Figura 9) de ação intracelular, que tem demonstrado bons resultados na criopreservação de embriões de peixes. De acordo com Harvey e Carolsfeld (1993), é a substância que mais facilmente permeia a membrana celular, entretanto sendo considerada a mais tóxica. Até o presente momento, o metanol (10%) apresentou melhores resultados para a criopreservação de embriões, náuplios e zoeas de peneídeos (NEWTON e SUBRAMONIAN, 1996; GWO e LIN, 1998).



**Figura 9.** Composição química do metanol.

d) Dimetilsulfóxido (DMSO)

É um composto orgânico (Figura 10), que possui elevada capacidade higroscópica decorrente de sua intensa afinidade pelo hidrogênio, formando pontes mais fortes que as formadas entre moléculas de água (BRAYTON, 1986). Já foram verificadas acima de trinta propriedades farmacológicas e terapêuticas do DMSO, as quais resultam da sua capacidade de interagir ou combinar com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídios, proteínas e muitas drogas sem alterar de forma irreversível a configuração molecular (SOJKA et al., 1990).



**Figura 10.** Composição química do DMSO.

Segundo Hafez (1995), esta substância age em concomitância com os efeitos causados pelo ritmo de congelamento, a concentração osmótica da solução conservadora, reduzindo seu efeito tóxico (desidratação do líquido intracelular) e permitindo conseqüentemente, o

congelamento relativamente mais lento do material genético, de modo a prevenir o surgimento de cristais de gelo intracelulares.

É um crioprotetor amplamente utilizado durante o congelamento e descongelamento e que possui alta permeabilidade celular. Entretanto, somente esta permeabilidade não consegue explicar seu efeito crioprotetor, pois apesar de preservar a integridade de proteínas isoladas e os fosfolipídios das membranas, em elevadas concentrações são conhecidos por serem tóxicos (ANCHORDOGUY et al., 1991). Jeyalectumie e Subramoniam (1989) mencionam que este crioprotetor é tóxico à temperatura ambiente. De acordo com Fahy et al. (1990), as amidas, quando adicionadas ao DMSO, tornam este menos tóxico do que quando são adicionados por exemplo ao etilenoglicol.

#### e) Trealose e Sacarose

A trealose é um dissacarídeo constituído de duas moléculas de glicose (Figura 11A) e a sacarose (Figura 11B) é um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose e uma de frutose, através de uma ligação O-glicosídica proveniente da reação entre a hidroxila de uma glicose com o carbono anomérico de outra (LEHNINGER et al., 2006).



**Figura 11.** Composição química dos dissacarídeos trealose (A) e sacarose (B).

De acordo com Anchordoguy et al. (1987) e De Leeuw et al. (1993), estes dissacarídeos são muito eficientes na preservação da integridade funcional e estrutural das membranas congeladas em nitrogênio líquido. Geralmente, os dissacarídeos são mais efetivos em estabilizar a bicamada lipídica que os monossacarídeos, pois se ligam às camadas lipídicas por pontes de hidrogênio, causando uma expansão destas camadas, diminuindo a temperatura de transição da fase de gel, minimizando a fusão das bicamadas lipídicas adjacentes, estabilizando o processo a partir de baixas concentrações. Estas ligações promovidas pelas pontes de hidrogênio são tão fortes, que permanecem ao longo de todo o processo de congelamento. Segundo Martins et al. (2008), a trealose e a sacarose foram uma das melhores soluções encontradas para a proteção do material nuclear.

## 4 Criopreservação de Invertebrados

Dados da FAO (2015) indicaram que na produção aquícola mundial em 2012 os países asiáticos continuaram dominando o cenário (88,39% do total produzido no mundo), liderados pela China com 61,69% (excluindo-se as plantas aquáticas), seguidos pela Índia (6,32%), com o Brasil aparecendo na 12ª posição, com 1,06% do total da produção mundial.

Ao analisar a evolução da produção aquícola de 2003 a 2009, o grupo de organismos cultivados que apresentou a maior taxa de incremento foi a dos invertebrados aquáticos, sendo 76,6% para crustáceos (famílias Penaeidae, Grapsidae e Palaemonidae), 19,3% para moluscos (famílias Ostreidae, Veneridae, Mytilidae e Pectinidae) e 209,5% para outros invertebrados, incluindo Stichopodidae (pepinos do mar - 102.261 toneladas), Rhizostomidae (62.969

toneladas) e Strongylocentrotidae (ouriço do mar - 6.130 toneladas) (LOPERA-BARRERO et al., 2011).

Na aquicultura, cerca de 200 espécies diferentes já tiveram seus sêmen criopreservados no âmbito da pesquisa (TIERSCH et al., 2007). Entretanto, pesquisas relacionadas a mecanismos de aumento da produção destes grupos de animais tendem a se intensificar, bem como a necessidade de se conservar seus recursos genéticos como estratégia para a segurança alimentar, conforme relatado por Paniagua-Chávez et al. (2011). Desta forma, segundo os mesmos autores, para a conservação dos recursos genéticos aquáticos, a FAO, em 2007, contemplou a criopreservação de germoplasmas (embriões, espermatozoides e ovócitos) como uma das alternativas, pois a manutenção dos gametas a baixas temperaturas, facilita seu transporte a diferentes unidades de reprodução, onde o material pode ser utilizado em programas de seleção genética, conservação de espécies em perigo de extinção (CABRITA et al., 2010) ou com interesse comercial (CHAO e LIAO, 2001).

Abaixo, estão relatados estudos relacionados a criopreservação de seus gametas e embriões para alguns grupos de invertebrados aquáticos.

#### a) Moluscos

Em virtude da malacocultura ser um sucesso em todo o mundo, estudos que viabilizem um aumento na produtividade, melhoras no crescimento, resistência a doenças, maior sobrevivência e formas de concha e programas de melhoramento ou de manutenção do patrimônio genético nativo das principais espécies de cultivo devem ser viabilizados. Desta forma, pesquisas relacionadas a criopreservação de sêmen de vários organismos estão sendo desenvolvidas.

Yankson e Moyse (1991) mencionam que a criopreservação de gametas de ostras proporcionaria um fornecimento de sementes o ano inteiro, evitando os problemas de sazonalidade. Estes autores, estudando criopreservação de sêmen de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), *C. tulipa* (Lamarck, 1819) e *C. iredalei* (Faustino, 1932) encontraram entre 87,3 e 92,6% de fecundação, utilizando o DMSO como crioprotetor em diversas concentrações (10-20%) dependendo da espécie. Paniagua-Chávez e Tiersch (2001) descreveram protocolo para criopreservação de sêmen e larvas de ostras *C. virginica* (Gmelin, 1791). Tervit et al. (2005) mencionam em seus estudos com *C. gigas*, que a criopreservação anda de mãos dadas com o melhoramento genético, uma vez que proporciona maior controle sobre os cruzamentos. Entretanto, segundo estes autores, estudo de criopreservação de sêmen de ostras já alcançou um patamar comercialmente viável, havendo a necessidade de se desenvolverem estudos com oócitos. Com esta finalidade, os mesmos apresentaram um protocolo de criopreservação para oócitos, utilizando o etilenoglicol 10% como crioprotetor, com sucesso de fecundação da ordem de 30,1%, chegando os animais à larva D.

Mexilhões do gênero *Mytilus* Linnaeus, 1798 estão entre os moluscos mais conhecidos, constituindo um importante elemento em ecossistemas costeiros, influenciando fortemente na ciclagem de nutrientes (ADAMS et al., 2009). De acordo com estes mesmos autores, em países da Oceania, programas de reprodução seletiva tem sido implementados. Di Matteo et al. (2009) encontraram resultados satisfatórios para criopreservação de sêmen de *M. galloprovincialis* Lamarck, 1819 utilizando etilenoglicol 7%. Para esta mesma espécie, Wang et al. (2011) utilizando DMSO 5% não encontraram resultados satisfatórios para a criopreservação de larvas, concluindo que mais estudos devem ser realizados.

*Haliotes* spp. é um dos três maiores moluscos produzidos em Taiwan, com uma produtividade de 1.800 toneladas e comercializados a 40 USD/Kg. Entretanto, a Austrália fornece a metade dos abalones comercializados internacionalmente *in vivo*, enlatados e congelados para a Ásia. Em 2004/05, as exportações alcançaram 260 milhões de dólares e

cerca de 4.000 das 5.600 toneladas produzidas, foram exportadas. Neste país, os produtores usam os ovos e espermatozoides dos adultos, que provêm de cultivo ou da natureza para povoar os tanques; depois de três a cinco dias, as larvas assentam e começam a se alimentar. Entretanto, esta forma de cultivo leva de três a quatro anos para que o abalone alcance o tamanho comercial (VIANA, 2007). Para estes animais, Gwo et al. (2002), encontraram 48% de sobrevivência espermática utilizando a concentração de  $10^5$  células/mL e DMSO 10%, tendo uma capacidade de fertilização maior que espermatozoides fresco de outras espécies de moluscos. Salinas-Flores et al. (2005) obtiveram resultados semelhantes de motilidade espermática utilizando glicerol 10% como crioprotetor.

#### b) Siris e Caranguejos

Segundo Lopera-Barreto et al. (2011), o caranguejo peludo chinês (*Eriocheir sinensis* Milne Edwards, 1853) e o siri *Scylla serrata* (Forskål, 1775) apareciam entre as 10 primeiras espécies de crustáceos mais produzidas em 2009, com 574.247 e 139.571 milhões de toneladas, respectivamente.

De acordo com sua relativa curta história de desenvolvimento, o cultivo de *E. sinensis* ainda está longe da perfeição técnica; entretanto, os maiores avanços tem sido alcançados na reprodução artificial, nas técnicas de produção de juvenis e em aditivos especiais que facilitem o processo de muda (FAO, 2013). A criopreservação de sêmen de *E. sinensis* foi realizado por Dong-Hua et al. (2008), encontrando sobrevivência de 62,6% quando fizeram uso do glicerol na concentração de 12,5% e por Huang et al. (2011) em embriões, sendo reportado os melhores resultados para embriões que já apresentavam coração, fazendo-se uso de propilenoglicol e dimetilformamida nas concentrações de 20%.

O siri *S. serrata* é uma espécie que já foi citada sendo cultivado em países do sudeste asiático e Austrália, alcançando altos preços no mercado local e internacional, sendo uma atividade tradicional sustentada pelos pescadores artesanais (IGARASHI, 2009). Em relação aos estudos com criopreservação com esta espécie, Jeyalectumie e Subramoniam (1989) encontraram maior sobrevivência espermática (95%) utilizando o glicerol e o DMSO + trealose como crioprotetores, por um período de 30 dias, congelados em nitrogênio líquido. Estes resultados foram superiores aos reportados por Bhavanishankar e Subramoniam (1997) para esta mesma espécie, que encontraram uma sobrevivência de 52% utilizando glicerol como crioprotetor e congelados em nitrogênio líquido.

#### c) Camarões

Apesar dos crustáceos decápodos possuírem grande importância econômica, as técnicas de criopreservação são muito escassas, principalmente para aqueles de água doce, sendo as informações limitadas, bem como a aplicação desta técnica a nível industrial, o que dificulta sua comercialização (SUBRAMONIAM, 1994; BENSON et al., 2012).

O processo da criopreservação envolve os passos da redução da temperatura celular, desidratação, congelamento e descongelamento (MEDEIROS et al., 2002). De acordo com Gwo (2000), Akarasanon et al. (2004), Castelo Branco (2010) e Benson et al. (2012), a criopreservação permite a estocagem do material genético, o que poderá vir a melhorar a genética de espécies animais, propiciar processos de hibridização, conservar a genética de populações, facilitar a translocação de espermatozoides entre fazendas, menor custo com manutenção de reprodutores, tem importância no processo de domesticação e diminuiria as limitações sazonais da reprodução natural. Na Tabela 1 seguem alguns protocolos já existentes para a criopreservação do sêmen/espermatóforo utilizados em camarões de água doce e marinho.

**Tabela 1.** Resultados de sêmen/espermatóforos criopreservados de diferentes espécies de camarões de água doce e marinho. (Continua)

Espécie <sup>1</sup>	Autor	Método coleta de esperma Diluyente + crioprotetor Embalagem de congelamento	Tempo de equilíbrio	Da temperatura ambiente até a temperatura subzero <sup>2</sup>	Condições de descongelamento	% sobrevivência <sup>3</sup>
<i>Macrobrachium rosenbergii</i> <sup>a</sup>	Chow et al. (1985)	Receptáculo de fêmeas Água filtrada com carvão ativo/solução salina + glicerol 10% Tubo de vidro	Água doce: 10, 15 e 30 min Sol. Salina: 30 e 60 min	Vapor de N <sub>2</sub> L/0, 5 e 10 min – 30 dias	30°C	Água doce: eclosão de 70% das larvas/IA Sol. Salina: 100% mortalidade/IA
<i>Macrobrachium rosenbergii</i> <sup>a</sup>	Akarasanon et al. (2004) e Damrongphol e Akarasanon (2008)	Eletroestimulação 9V ST: Água deionizada + Glicerol ou etilenoglicol 10 ou 20% LT: Água deionizada + etilenoglicol 20% Criotubo	15 min	ST: -20°C por 10 dias LT: 15 min até -70°C, sendo 1,5-2,5°C/min; exposição ao vapor de N <sub>2</sub> L/1-2 min e mergulho a -196°C por 350 dias	30°C/5 min	ST: <20%/TP e 0%/IA LT: >80%/TP e ~ 55%/IA
<i>Sicyonia ingentis</i> (Burkenroad, 1938) <sup>b</sup>	Anchordoguy et al. (1988)	Receptáculo de fêmeas Água do mar artificial + DMSO 5%, glicerol 0,5M, sacarose 0,25M, trealose 0,25M e prolina 0,25M Criotubo	5 min	5°C/min até 0°C; depois foram resfriadas até -30°C (3,5,7,9,13,15,17 ou 150°C/min e então mergulhadas em N <sub>2</sub> L/ 30 dias	22°C	56,3% com DMSO 5%/ RA
<i>Penaeus indicus</i> Milne Edwards, 1837 <sup>b</sup>	Diwan e Joseph (1999)	Eletroestimulação Água do mar filtrada + glicerol 5%, DMSO 5%, (DMSO 5%+glicerol 5%) ou (DMSO 5%+trealose 0,25M) ou trealose 0,25M Criotubo	5 min	1°C/min até -35°C; expostas em vapor de N <sub>2</sub> L/5 min e depois congeladas a -196°C, por 7, 15, 30 e 60 dias a 0°C, -30°C e -196°C.	20°C	Glicerol + DMSO = 75,5% DMSO + trealose = 78,1% Glicerol = 675% DMSO = 68,9% em 30 dias/RA. Viabilidade 60 dias = ñ sig.

**Legenda.** 1) (a) o material criopreservado foi o espermatóforo e (b) massa espermática; 2) ST: estocagem por um pequeno período de tempo e LT: estocagem por um longo período de tempo; 3) método de avaliação da sobrevivência espermática: CF = citometria de fluxo, EN = eosina-nigrosina, IA = inseminação artificial, RA = reação acrossômica, TP = tripan blue.

**Tabela 1.** Continuação.

Espécie <sup>1</sup>	Autor	Método coleta de esperma Diluyente + crioprotetor Embalagem de congelamento	Tempo de equilíbrio	Da temperatura ambiente até a temperatura subzero <sup>2</sup>	Condições de descongelamento	% sobrevivência <sup>3</sup>
<i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone, 1931) <sup>ab</sup>	Lezcano et al. (2004)	Compressão abdominal Água do mar esterelizada + metanol, DMSO, etilenoglicol e glicerol 10% + gema de ovo 10% + sacarose 0,2M Criotubo	Espermató foro = 1h Massa espermática = 15 min	-0,5°C/min até -32°C e depois mergulhado em N <sub>2</sub> L; a -6°C foi feito contato para congelamento/ 3 dias	28°C	Metanol 10% = 25%/TP e 34,1%/CF
<i>Penaeus monodon</i> Fabricius, 1798 <sup>a</sup>	Vuthiphandchai et al. (2007)	Compressão abdominal Solução salina livre de cálcio + DMSO 5% Criotubo	30 min	-2°C até -80°C e imerso em N <sub>2</sub> L/ 210 dias	30°C	60 dias = 87,3% 210 dias = 46,7% EN 60 dias = 71,6%/IA
<i>L. vannamei</i> <sup>b</sup>	Salazar et al. (2008)	Compressão abdominal Água do mar esterelizada + metanol 10% + gema de ovo 10% + sacarose 0,2M Palhetas	10 min a 4°C	-0,5°C/min até -6°C – contato manual -0,5°C/min até -32°C – mergulho em N <sub>2</sub> L/ 2 h	20°C	85,6%/TP
<i>L. schmitti</i> Burkenroad, 1936 <sup>ab</sup>	Bambozzi et al. (2014)	Compressão abdominal Solução salina livre de cálcio + DMSO 10% ou Glicerol 10% Palhetas e criotubos	30 min a temperatura ambiente	-0,5°C/min até -32°C e depois mergulhado em N <sub>2</sub> L/30 dias	Palhetas = 20°C/10s Criotubos = 30°C/2s	Massa Glicerol 10% ≈ 55% EN SPTF Glicerol 10% ≈ 33%
<i>L. schmitti</i> <sup>b</sup>	Castelo Branco et al. (2014)	Compressão abdominal Solução salina livre de cálcio + Glicerol 5% e 10% Palhetas	30 min a temperatura ambiente	-0,5°C/min até -32°C e depois mergulhado em N <sub>2</sub> L/30 dias	20°C/10s	Glicerol 5% = 17,16% e 10% = 15,36% EN

**Legenda.** 1) (a) o material criopreservado foi o espermatóforo e (b) massa espermática; 2) ST: estocagem por um pequeno período de tempo e LT: estocagem por um longo período de tempo; 3) método de avaliação da sobrevivência espermática: CF = citometria de fluxo, EN = eosina-nigrosina, IA = inseminação artificial, RA = reação acrossômica, TP = tripan blue.

Segundo Anchooguy et al. (1988), Subramonian (1994), Lezcano et al. (2004) e Salazar et al. (2008), um dos principais inconvenientes para a criopreservação de sêmen de camarões é a falta de métodos confiáveis para a determinação da sobrevivência celular após o descongelamento. As células espermáticas dos camarões não apresentam motilidade, portanto não é possível utilizar este parâmetro como indicador de sua sobrevivência. A análise pelo método de taxa de fertilização é difícil de ser utilizado devido ao fato de existir uma lacuna entre o acoplamento do espermatóforo e o momento da desova, pois apesar de que as células descongeladas possam estar viáveis, elas devem se manter aderidas à fêmea até o momento da desova. Portanto, a avaliação de sobrevivência celular é feita principalmente pela análise do morfotipo sob microscopia óptica e de métodos colorimétricos como o azul de tripano (LEUNG-TRUJILLO e LAWRENCE, 1987; ROSAS et al., 1993; PASCUAL et al., 1998) e a coloração por eosina e nigrosina (JEYALACTUMIE e SUBRAMONIAM, 1989; NIMRAT et al., 2006). Entretanto, uma elevada taxa de sobrevivência espermática pode não garantir uma alta taxa de fertilização, conforme observado por Akarasanon et al. (2004), embora este ainda seja considerado o melhor critério para se determinar o sucesso de uma criopreservação.

De acordo com Anchooguy et al. (1988), Wang et al. (1995) e Bhavanishankar e Subramoniam (1997), a sensibilização hipostômica, a inseminação artificial, o contato esperma-ovo, análises bioquímicas e indução da reação acrossômica pela água do ovo, podem ser utilizados como mecanismos para se determinar a qualidade dos sêmen criopreservados em crustáceos.

Outro problema apresentado até o momento na criopreservação de sêmen/espermatóforo de camarões é o tempo de viabilidade deste material congelado quando comparado a outras espécies animais. Akarasanon et al. (2004), criopreservando sêmen de *M. rosenbergii* a -20°C durante 20 dias, utilizando glicerol e etilenoglicol nas concentrações 10 e 20%, observaram redução da sobrevivência espermática a partir do 10º dia de estocagem e, quando criopreservou em nitrogênio líquido (-196°C) com etilenoglicol 20%, também houve redução na sobrevivência espermática ao longo do tempo, entretanto, encontrou 75% de sobrevivência no 200º dia de estocagem. Quedas na sobrevivência também puderam ser observados por Nimrat et al. (2006) para *Litopenaeus vannamei*, Bambozzi et al. (2014) e Castelo Branco et al. (2014) para *L. schmitti*.

De acordo com Gwo (2000), o congelamento em nitrogênio líquido varia com o tipo de equipamento utilizado durante o processo, o tamanho da palheta ou criotubo e a posição da amostra nos tambores de congelamento. Segundo Martínez-Pastor e Adams (2008), o sucesso do armazenamento do germoplasma não depende somente do protocolo de criopreservação, mas também da escolha dos equipamentos para empregá-los e seu bom uso. Estes autores descrevem vários equipamentos que podem ser utilizados para a criopreservação de sêmen, destacando desde os métodos mais simples (com menor controle dos parâmetros de congelamento) aos mais complexos, sumarizados na Tabela 2.

#### d) Lagostas

Embora a produção aquícola de lagostas seja uma proposta atraente em todo o mundo, pois as espécies são geralmente de alto valor, a demanda grande e a produção pesqueira não pode ser aumentada. Programas de pesquisa e desenvolvimento tem procurado fomentar este setor, mas até o momento, nenhuma delas foi bem sucedida. Pesquisa relacionada à criopreservação de sêmen foi conduzida por Sasikala e Meena (2009), que obtiveram como resultado 61,4% de sobrevivência utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) 5% + glicerol 10% como agentes crioprotetores por um período de 25 dias em nitrogênio líquido.

**Tabela 2.** Materiais e equipamentos utilizados para criopreservação.

Materiais e equipamentos empregados para congelamento	
Simplex	Complexos
a) Gelo seco: dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> ) sólido que na fase de gás mantém a temperatura a -78,5°C; taxa de resfriamento -35°C min <sup>-1</sup> ; congelamento heterogêneo de acordo com o tamanho da amostra.	a) Biofreezers: utilizam N <sub>2</sub> L que são injetados em forma de vapor, usando uma valva de controle e possuindo sensor que regula a taxa de resfriamento até a temperatura desejada.
b) Álcool (metanol, etanol ou isopropanol 95%): misturado a gelo seco procedendo o controle da taxa de congelamento.	
c) Nitrogênio Líquido (N <sub>2</sub> L): mantém a temperatura em -196°C; pode ser utilizado consorciado com outros métodos mais simples visando adaptar a taxa de resfriamento antes da completa imersão.	
Materiais e equipamentos comuns aos dois métodos de congelamento	
a) palhetas: cilindros plásticos com poucos diâmetros em relação ao seu comprimento; 0,5; 0,25mL ou minitubos.	
b) criotubos: cilindros plásticos de maior proporção utilizados para criopreservar maiores volumes; vários volumes até 4,5mL.	
c) mecanismos de vedação: polivinil para palhetas e tampas para criotubos.	
d) contêiner, botijão ou tambor: onde serão estocadas as palhetas ou criotubos nas racks ou canecas de metal e mergulhados em N <sub>2</sub> L.	

Fonte: Martínez-Pastor e Adams (2008).

#### e) Ouriço do mar

De acordo com os dados da FAO reportados por Lopera-Barrero et al. (2011), os ouriços do mar representaram 6.130 toneladas do volume de invertebrados capturados em 2009, movimentando um valor da ordem 21.185 milhões de dólares. De acordo com Fabbrocini e D'Adamo (2010), suas gônadas são consideradas iguarias, sendo apreciadas em muitas partes da Europa, especialmente na França e sul da Itália. Em virtude dos estoques selvagens estarem declinando neste continente, em consequência principalmente das mudanças ambientais, durante a década passada existiu um significativo aumento de esforços para desenvolverem seu cultivo em cativeiro e pesquisas relacionadas a indução do ciclo gametogênico destes animais em confinamento, mediante alterações na temperatura, fotoperíodo e disponibilidade de alimento.

Embora não se tenha relato de estruturas de cultivo, algumas espécies tiveram o sêmen e seus estágios de desenvolvimento larval descritos em experimentos de criopreservação, alcançando-se relativo sucesso, como aqueles reportados por Adams et al. (2006), que criopreservaram larvas utilizando DMSO 1,5M e conseguiram que estas metamorfoseassem e sedimentassem no fundo do tanque e Bellas e Paredes (2011) criopreservaram embriões no estágio de blástula com DMSO 1,5M + trealose 0,04M, obtendo um crescimento larval em 98% das células, quando incubadas em água do mar por 96 h, concluindo que os resultados encontrados podem contribuir para uma maior disponibilidade de material biológico.

## **CAPÍTULO I**

### **DETERMINAÇÃO DE VOLTAGEM E DO TAMANHO DE *Macrobrachium acanthurus* PARA A EXTRAÇÃO DO ESPERMATÓFORO**

## RESUMO

Os camarões de água doce se encontram distribuídos no continente americano incluindo o Brasil. *M. acanthurus* é capturado e consumido principalmente pelas populações tradicionais, além de ser uma espécie identificada com potencial para o cultivo em cativeiro, em virtude do seu tamanho. Até o presente momento, os estudos sobre a reprodução desta espécie estão pouco avançados, sendo importante em virtude de sua possibilidade de cultivo. O objetivo deste trabalho foi identificar a voltagem mais adequada para a extração dos espermatóforos e o menor tamanho com que os camarões os produzem, como um primeiro passo para desenvolver técnicas de fecundação *in vitro*. Foram utilizadas as voltagens de 4,5 e 6,0 volts, realizando-se a contagem de sobrevivência espermática em esfregaço de sêmen corado com eosina-nigrosina; também foi comparada a sobrevivência espermática entre as metades direita e esquerda. Para o estudo dos tamanhos, os camarões foram separados em intervalos de classes e analisados quanto à produção de espermatóforos e sobrevivência espermática. A melhor voltagem para a extração do material seminal, em virtude das menores taxas de mortalidade, foi 6,0 volts e a partir de 5,00 g de peso vivo e 18,00 mm de comprimento de cefalotórax, os camarões podem ser utilizados para extração de espermatóforos.

**Palavras-chave:** Caridea, Espermatozoides, Reprodução, Sobrevivência espermática.

## RESUMEN

**Determinación del voltaje y el tamaño para la extracción de espermátóforos en el camarón de agua dulce *Macrobrachium acanthurus*.** Los langostinos se encuentran distribuidos en el continente americano incluyendo Brasil. *M. acanthurus* es colectado y consumido principalmente por las poblaciones tradicionales y además es una especie que fue identificada con potencial para el cultivo en cautiverio dado su tamaño. Hasta el momento los estudios sobre reproducción de esta especie están poco avanzados siendo importantes si se prevé la posibilidad de su cultivo. El objetivo de este trabajo fue identificar el voltaje más adecuado para la extracción de los espermátóforos y la menor talla con que los camarones los producen como paso previo a desarrollar técnicas de fecundación *in vitro*. Fueron utilizados los voltajes de 4,5 y 6,0 voltios, realizándose el conteo de los espermatozoides en base a la supervivencia espermática en frotis coloreados con eosina-nigrosina; también se comparó el número de espermatozoides de las mitades derecha e izquierda del espermátóforo. En el estudio del tamaño, los langostinos fueron separados en intervalos de clases y analizados en cuanto a la producción de espermátóforos y la supervivencia espermática. El mejor voltaje para la extracción del material seminal debido a menores mortalidades fue 6,0 voltios y a partir de los 5,00 g de peso corporal y 18,00 mm de longitud de caparazón los langostinos podrían ser utilizados para la extracción de espermátóforos.

**Palabras-clave:** Caridea, Espermatozoides, Reproducción, Supervivencia espermática.

## ABSTRACT

**Determination of adequate voltage and animal size for the extraction of spermatophores in the freshwater prawn *Macrobrachium acanthurus*.** The freshwater prawns are distributed throughout the Americas including Brazil. *M. acanthurus* is caught and consumed mainly by traditional populations and besides that, it is a species with potential for aquaculture because of its size. Studies on this species reproduction are poorly developed being necessary for culture. The purpose of this study was to identify the best voltage for spermatophores extraction and smaller sizes producing spermatophores. Two voltages were assayed (4.5 and 6.0 volts) with sperm counts made based on sperm survival after eosin-nigrosin staining; the production by the right and left halves of each spermatophore were also compared. Prawns were also separated into class intervals and the productions of spermatophores and sperm survival were analyzed. At the end of the experiments, 6.0 volts was considered the best voltage for seminal material removal due to lower mortality and animals weighting at least 5.00 g and 18.00 mm of total length could be used for reproduction studies.

**Keywords:** Caridea, Sperm, Reproduction, Sperm survival.

## 1 INTRODUÇÃO

Denominados popularmente como camarão canela ou pitu, *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) encontra-se distribuído em todo o continente americano e nas Antilhas, sendo encontrado no Brasil, do Pará ao Rio Grande do Sul (FONSECA, 1995; CAMACHO et al., 1997; COELHO e RAMOS-PORTO, 1998; TORATI et al., 2011).

É um camarão com grande potencial para o cultivo e de considerável importância econômica, principalmente para as populações ribeirinhas que o exploram de forma artesanal (VALENTI et al., 1989). Segundo Coelho et al. (1982), a maior parte dos animais comercializados provêm da pesca em ambientes naturais, o que tem contribuído para uma drástica redução dos estoques naturais, bem como as alterações ambientais ocasionadas pelo homem, tais como a poluição, os aterros e as construções de barragens, que impedem as migrações feitas pela maioria das espécies durante o período reprodutivo.

*Macrobrachium acanthurus* é uma espécie dióica, apresentando dimorfismo sexual caracterizado pela presença do apêndice masculino no segundo par de pleópodos e as fêmeas por sua ausência. Os machos possuem um aparelho reprodutor composto por testículos, vasos deferentes, saco espermatofórico (ampola terminal) e glândulas androgênicas (CARVALHO, 1980). Segundo Díaz et al. (2002a), a ampola terminal é uma região muscular, que pode ser vista durante a contração do vaso deferente e expulsão dos espermátóforos, que consiste de uma matriz eosinófila, uma basofílica e um par de massa espermática aderida na matriz basofílica e em geral, apresentando uma simetria bilateral (CHOW et al., 1982; DOUGHERTY et al., 1986).

Segundo Albertoni et al. (2002a), é uma das espécies consideradas de grande porte, alcançando a maturidade sexual no primeiro ano de vida, variando de 33,00 a 180,00 mm nos machos e de 26,00 a 96,00 mm nas fêmeas, podendo carregar numerosos ovos pequenos (FONSECA, 1995). Valenti (1985) menciona que em camarões de água doce do gênero *Macrobrachium* Bate, 1868, os machos adultos atingem tamanhos, em geral, maiores que as fêmeas e apresentam o cefalotórax e o segundo quelípodo proporcionalmente mais desenvolvidos.

A fecundidade em camarões de água doce tem sido correlacionada com o tamanho ou peso do sexo feminino, conforme relatado por Mejía-Ortíz et al. (2001) para o gênero *Macrobrachium*; Müller et al. (1992) e Tamburus et al. (2012) para *M. acanthurus*; García-Dávila et al. (2000) para *M. brasiliense* (Heller, 1862); Massolin e Bueno (2002) e Antunes e Oshiro (2004) para *M. potiuna* (Müller, 1880) e Da Silva et al. (2004) e Hayd e Anger (2013) para *M. amazonicum* (Heller, 1862). Para machos, estudos que relatam a relação entre o tamanho do macho e a quantidade de esperma tem estado restrito a espécies marinhas, conforme relatado por Alfaro-Montoya (1993) para *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1874); Pratoomchat et al. (1993) para *Penaeus monodon* Fabricius, 1798; Díaz et al. (2001) para *Pleoticus muelleri* (Bate, 1888) e Ceballos-Vázquez et al. (2003 e 2010) para *L. vannamei* (Boone, 1931).

O cultivo de crustáceos depende basicamente da manutenção de um estoque de reprodutores que possa assegurar a continuidade da produção larval durante todo o ano (CARVALHO, 1980). Ocorrendo em quase todo o território nacional, o cultivo de *M. acanthurus* não ofereceria riscos à natureza por escape dos viveiros de aquicultura, como observado nas produções de espécies exóticas. Desta forma, estudos que gerem informações para subsidiar técnicas de produção são necessários, seja através dos sistemas de cultivo comercial, ou através de exploração racional dos estoques naturais, evitando-se os riscos do seu esgotamento.

Para o crescimento da carcinicultura foi necessário investir em tecnologias de produção, manejo, reprodução e, mais recentemente, no melhoramento genético das espécies com potencial produtivo. As biotecnologias de reprodução têm como objetivo principal otimizar o aproveitamento dos gametas masculinos e femininos, e a produção de indivíduos de origem conhecida. Por este motivo, a criopreservação do sêmen permite a estocagem de material genético, bem como facilita o transporte deste e sua comercialização (CASTELO BRANCO, 2010) e ainda, de acordo com Ballou (1992), muitas espécies nativas podem ser mantidas se a criopreservação e os germoplasmas armazenados puderem ser utilizados para reproduzirem as espécies em cativeiro.

A obtenção de material genético pode ser feita por dissecação de machos congelados, eletroestimulação ou compressão abdominal. De acordo com Goldberg (1998), embora a dissecação dos machos congelados seja menos prática que a eletroestimulação, permite a utilização de toda extensão do canal deferente, proporcionando maior volume de sêmen para posterior inseminação artificial, através da utilização de seus fragmentos.

O método de extração do espermátóforo seja por eletroestimulação ou compressão abdominal pode influenciar na produção e qualidade espermática, apesar de permitir o reaproveitamento do reprodutor. A técnica de eletroestimulação tornou-se a mais difundida por ser mais rápida e fornecer o espermátóforo na forma como ocorre a fertilização na natureza, sendo tal técnica utilizada pela primeira vez em *Macrobrachium rosenbergii* De Man, 1879, por Sandifer e Lynn (1980).

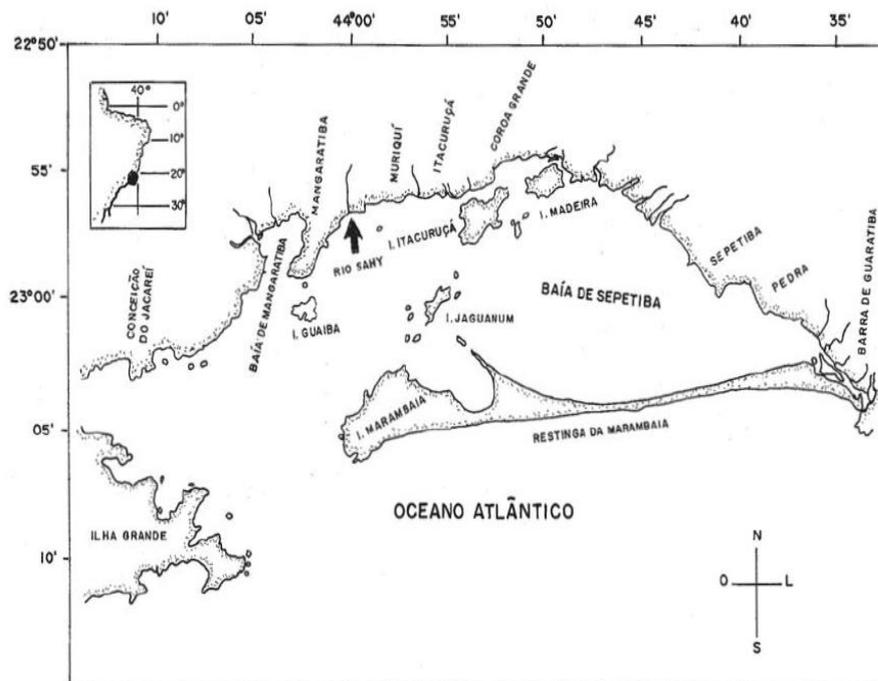
Esta mesma técnica foi empregada com sucesso por Kooda-Cisco e Talbot (1983) na lagosta *Homarus americanus* Milne-Edwards, 1837; Goldberg e Oshiro (2000) para *M. rosenbergii* e Jerry (2001), para a lagosta de água doce *Cherax destructor* Clark, 1936, observando que a técnica permitiu a expulsão completa ou parcial dos espermátóforos em 75% dos animais, no entanto os autores não testaram sua regeneração.

Considerando que *M. acanthurus* representa uma potencial fonte econômica para o cultivo de camarão de água doce no Brasil, estudos que enfoquem sua reprodução ainda são necessários. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram determinar a voltagem mais adequada para a extração dos espermátóforos desta espécie, verificando sua capacidade de regeneração e manutenção do potencial reprodutivo do macho, e o tamanho com que estes animais iniciam sua contribuição à reprodução.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Machos de *Macrobrachium acanthurus*, para ambos os estudos, foram capturados nos meses de verão (pico reprodutivo) de 2011 a 2013 no rio Sahy (22°56'S; 44°01'W), Mangaratiba/RJ e conduzidos vivos à Estação de Biologia Marinha da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em Itacuruçá, distrito de Mangaratiba/RJ (Figura 1).

A área de estudo é caracterizada por apresentar substrato areno-lodoso, sendo sua nascente localizada na região da Serra do Piloto e sua foz na Praia do Sahy. Todos os exemplares foram capturados fazendo uso de puçás em área de cachoeiras, com correnteza acentuada, inúmeras rochas e vegetação marginal composta principalmente por árvores.



**Figura 1.** Mapa com a localização geográfica da área de captura dos animais em estudo.

### 2.1 Avaliação da Voltagem

Foram capturados um total de 14 camarões, capturados em dezembro de 2011, sendo transportados vivos até o laboratório, onde foram acondicionados individualmente em aquários de 24 L.

Visando manter um ambiente o mais similar possível ao natural, os aquários foram dotados de areia como substrato, vegetação, abrigos artificiais e aeração constante. A renovação da água ocorreu a cada três dias e parâmetros como a temperatura foi monitorada diariamente com auxílio de termômetro digital, a amônia e o nitrito a cada dois dias, usando-se kit colorimétrico. A alimentação foi fornecida diariamente as 10 e 17 h, sendo constituído de um mix de músculo de peixe e camarão marinho (alimentação fresca) e ração comercial para reprodutores marinhos (alimentação seca - Tabela 1), na proporção de 1:1, na base de 10% do peso vivo.

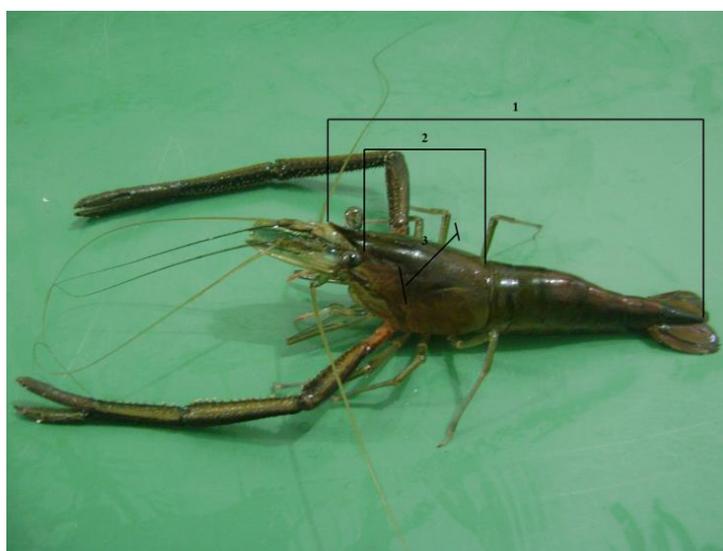
Após um período de aclimação de 48 h, os camarões foram medidos quanto ao comprimento total (da extremidade do rostro à extremidade do télson), comprimento do

cefalotórax (da base do pedúnculo ocular até a extremidade posterior do cefalotórax) e largura do cefalotórax (medida compreendida entre as laterais direita e esquerda do cefalotórax) (Figura 2), e distribuídos igualmente e de forma aleatória em dois tratamentos, sendo sete animais por tratamento, correspondendo as voltagens de 4,5 e 6,0 volts (V).

**Tabela 1.** Níveis de garantia por quilograma e composição centesimal de ração fornecida aos reprodutores.

<b>Níveis de garantia/Kg*</b>	
Proteína Bruta	500 mg
Extrato Etéreo	100 mg
Fibras	40 g
Matéria Mineral	100 g
Umidade	120 g
Cálcio	2,5 – 20 g
Fósforo	10 g
<b>Composição centesimal (%)*</b>	
Proteína Bruta	50
Lipídios	10
Fibras	4
Umidade	12

\* Fornecido pelo fabricante. Inve Aquaculture INC.



**Figura 2.** Medidas biométricas do camarão de água doce. 1 – comprimento total (CT), 2 – comprimento do cefalotórax (CC) e 3 – largura do cefalotórax (LC).

Durante os testes de eletroestimulação, os animais foram inicialmente sensibilizados por imersão em água gelada e posteriormente posicionados em um estereomicroscópio com a região ventral voltada para o operador, sendo os fios do eletrodo contatados próximo ao gonóporo masculino, na base da coxa do quinto par de pereiópodos, provocando contrações musculares e a completa ou parcial expulsão dos espermatóforos armazenados na ampola

terminal do canal deferente (Figuras 3A-C). Considera-se expulsão parcial, quando apenas um espermátóforo era liberado, independente do gonóporo.

No momento em que ocorreu a expulsão simultânea dos espermátóforos e consequentemente a união dos dois pela sua alta adesividade (Figura 3C), os mesmos foram separados a fim de que cada espermátóforo constituísse uma unidade experimental, direita e esquerda. A sobrevivência espermática média obtida entre os pares foi utilizada para integrar a contagem média de cada voltagem.

Posteriormente, cada espermátóforo foi acondicionado em tubo plástico tipo eppendorf de 2 mL contendo 0,5 mL de água destilada, onde foi macerado até se observar o completo rompimento do material e homogeneização com o meio diluidor, formando uma solução espermática (Figura 3D).

Para o teste de sobrevivência espermática, uma alíquota de 50  $\mu$ L da solução espermática foi retirada e diluída em 25  $\mu$ L de nigrosina a 10% e 25  $\mu$ L de eosina a 0,5%. Após a homogeneização desta solução, realizou-se o esfregaço em lâmina de microscopia para observação em microscópio óptico, em aumento de 40X (Figuras 3E-G). A porcentagem média para a viabilidade espermática foi calculada através da contagem de células vivas e mortas, no mínimo de 100 células por lâmina, sendo duas réplicas por amostra. As células mortas apresentaram-se coradas pela eosina (róseas), e as células vivas não apresentavam coloração, mostrando-se translúcidas em contraste com o fundo arroxeadado da nigrosina (Figura 3H).

A eletroestimulação foi realizada a cada 15 dias, totalizando quatro extrações em um período de 45 dias, observando-se a capacidade de regeneração do espermátóforo em cativeiro. Desta forma, a primeira eletroestimulação continha espermátóforos produzidos na natureza e as demais em cativeiro. Cada animal foi submetido à eletroestimulação somente no período de intermuda.

Com o intuito de verificar as diferenças estatísticas entre as voltagens estudadas, os dados foram submetidos ao teste Shapiro-wilk para observação de normalidade dos mesmos e Levene para homocedasticidade. Como estes se apresentaram não-paramétricos, foi aplicado o teste Mann-Whitney para testar a diferença entre a eficiência de extração (sobrevivência espermática e taxa de mortalidade), a um nível de 5% de significância. O mesmo foi aplicado para se determinar a diferença entre as sobrevivências espermáticas quando analisada a produção espermática entre as metades direita e esquerda do macho e o teste de Bonferroni ( $\alpha=0,05$ ) para determinar a existência de diferença entre os períodos amostrais.

## **2.2 Efeito do Comprimento e Peso sobre a Produção de Espermátóforos**

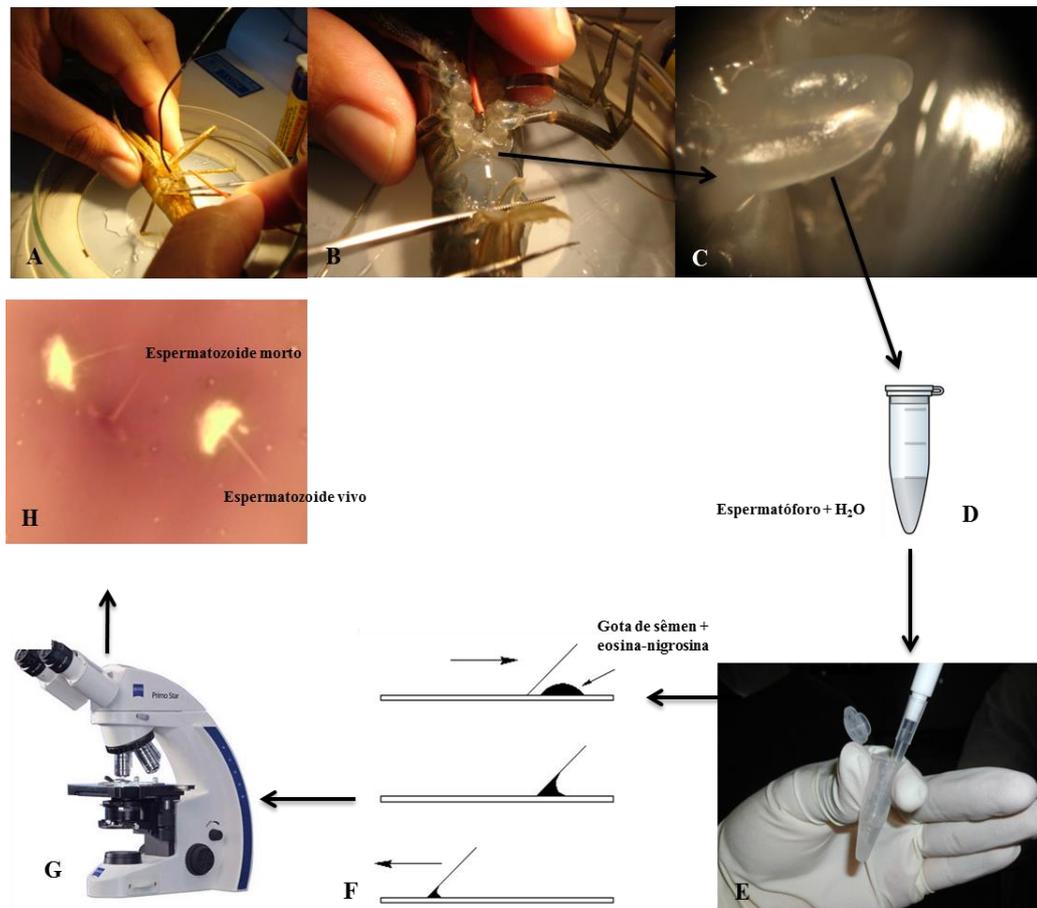
Para este experimento foram utilizados um total de 204 machos, capturados entre os meses de dezembro/2012 a fevereiro/2013. Os animais foram mantidos vivos sob as mesmas condições mencionadas no Experimento 1, bem como a coleta dos parâmetros ambientais, da alimentação fornecida e dos dados biométricos.

Os ensaios de voltagem realizados no Experimento 1 indicaram a melhor voltagem para extração de espermátóforos, sendo esta então adotada para este segundo experimento. A metodologia para extração seguiu os procedimentos anteriormente descritos e posteriormente, os espermátóforos foram pesados individualmente em balança analítica com precisão de 0,1mg. Para efeito das análises do Experimento 2, os animais foram eletroestimulados apenas uma vez, portanto, levando-se em consideração apenas os espermátóforos produzidos em ambiente natural.

Com o intuito de se averiguar uma possível interação dos comprimentos do cefalotórax e total e do peso do camarão, com a produção de espermátóforos, foi realizada uma regressão múltipla ( $\alpha=0,05$ ), considerando o peso do espermátóforo como a variável

dependente. Levando-se em consideração os melhores resultados, os camarões foram distribuídos em intervalos de classe, onde verificaram-se a presença ou ausência dos espermátóforos e no caso da presença, se o macho apresentava um ou dois. O teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), com nível de significância 5%, foi aplicado para verificar uma possível diferença na produção dos espermátóforos. Para determinar o comprimento ou peso ao qual 50% (CC<sub>50%</sub> ou P<sub>50%</sub>) dos machos encontravam-se maduros sexualmente e produziram ao menos um espermátóforo, foi utilizado o programa computacional Solver, do Excel 2010.

Foi realizada também uma correlação de Pearson ( $\alpha=0,05$ ) entre o peso médio dos espermátóforos, obtido pela média do peso de cada espermátóforo de um determinado animal, com o comprimento do cefalotórax (CC) e peso do camarão.



**Figura 3.** Esquema do procedimento metodológico para eletroestimulação e contagem de sobrevivência espermática. (A-B) extração dos espermátóforos; (C) espermátóforos; (D) espermátóforos individualizados adicionados a solução crioprotetora ou água, que para homogeneização; (E-F) retirada da alíquota para produção do esfregaço; (G) observação dos espermatozoides em aumento de 40X; (H) diferença entre espermatozoides vivos e mortos.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Avaliação da Voltagem

A temperatura média da água durante o período experimental foi de  $23,70 \pm 1,22^\circ\text{C}$ . Os teores de amônia e nitrito foram de  $1,28 \pm 0,56$  ppm e  $1,44 \pm 1,62$  ppm, respectivamente. De um total de quatro períodos de extrações, foram obtidos 26 espermatóforos para o grupo de camarões eletroestimulados com 4,5V e 29 para o grupo experimental 6,0V. Apesar de 100% dos camarões terem produzido espermatóforos, a diferença na quantidade destes, se deve ao fato, de que a cada procedimento de eletroestimulação, os animais apresentavam a completa ou parcial expulsão dos espermatóforos, existindo situações em que camarões que tiveram uma completa extração em uma determinada etapa da eletroestimulação, em outra subsequente apresentava apenas extração parcial e vice-versa. Para 4,5V, em nove oportunidades ocorreram extração dos dois espermatóforos e para 6,0V em 11; e com extração parcial em oito e sete oportunidades, respectivamente.

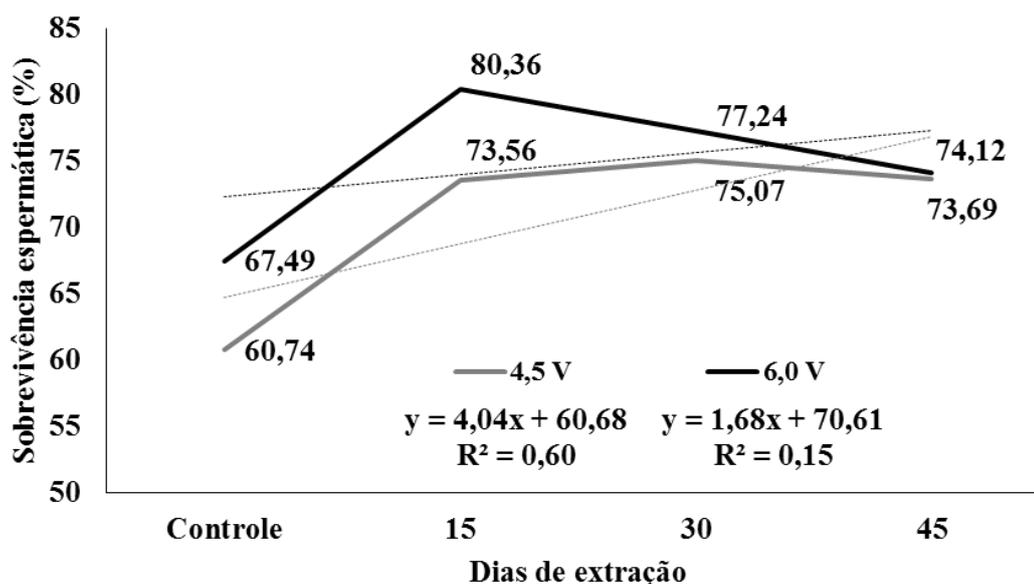
Entretanto, os testes estatísticos apontaram não haver diferença ( $p>0,05$ ) entre as voltagens testadas e as metades direita e esquerda (Tabela 2), bem como quando comparadas às sobrevivências espermáticas entre os diferentes períodos de extração ( $p>0,05$ ) (Figura 4).

**Tabela 2.** Médias e desvios padrões dos dados biométricos de *Macrobrachium acanthurus*, taxas de sobrevivência espermática e de mortalidade ao final das quatro eletroestimulações.

Parâmetros analisados	4,5 V (26)	6,0 V (29)
Comprimento total – CT (mm)	$87,50 \pm 14,33^a$	$88,71 \pm 15,89^a$
Comprimento cefalotórax – CC (mm)	$24,28 \pm 5,27^a$	$25,11 \pm 5,42^a$
Largura cefalotórax – LC (mm)	$14,42 \pm 2,89^a$	$15,56 \pm 3,41^a$
Sobrevivência espermática Média (%)	$69,68 \pm 15,41^a$	$68,71 \pm 16,44^a$
Sobrevivência espermática Metade Direita (%)	$65,16 \pm 17,53^a$	$72,10 \pm 17,05^a$
Sobrevivência espermática Metade Esquerda (%)	$73,17 \pm 11,44^a$	$65,55 \pm 15,77^a$
Taxa de mortalidade (%)	$71,43^a$	$42,86^b$

\* Médias seguidas de letras iguais não diferiram significativamente entre si. (n) amostral ao lado das voltagens.

Em relação à taxa de mortalidade dos camarões, esta foi observada próximo ao final do período experimental. Este fato pode estar associado ao estresse provocado pelas sucessivas eletroestimulações e a quantidade de estímulos necessários - embora não contabilizados - para a extração do espermatóforo, sendo maior para 4,5V. Em 12 ocasiões, os camarões realizaram muda pós-eletroestimulação, sendo oito delas observadas para aqueles do grupo 4,5V. Entretanto, animais que estavam no período intermuda, bem como aqueles que não estavam, produziram espermatóforos.



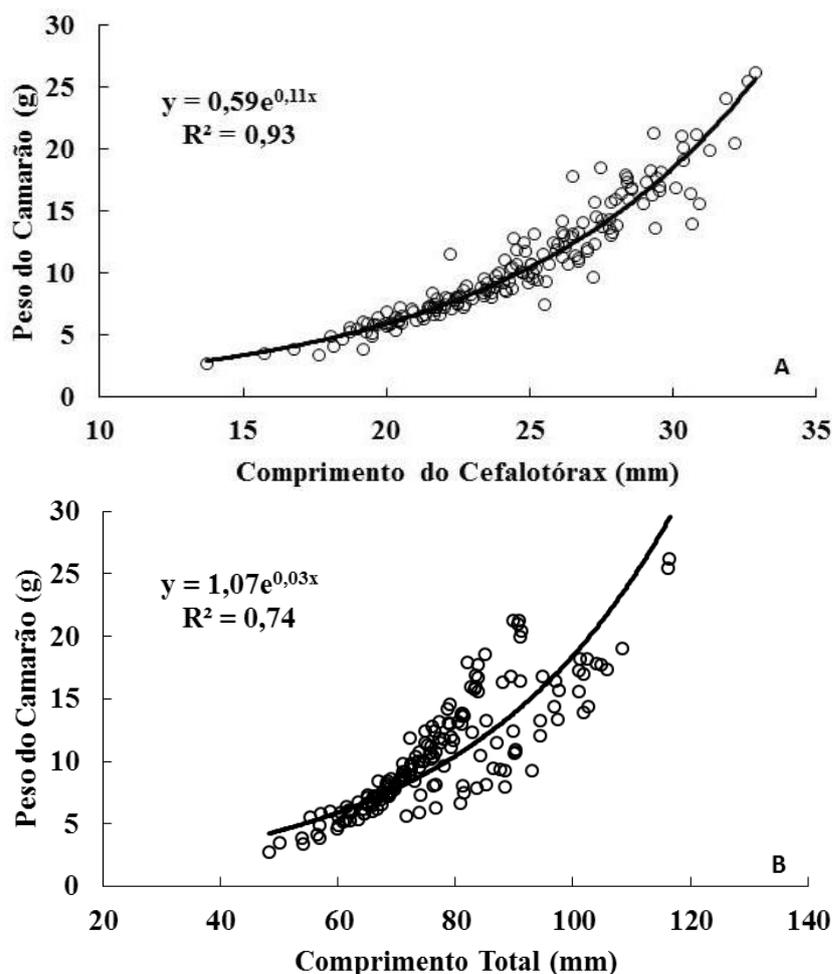
**Figura 4.** Taxa de sobrevivência espermiática de *Macrobrachium acanthurus* para as voltagens estudadas nos diferentes períodos de extração de espermatóforos.

### 3.2 Efeito do Comprimento e Peso sobre a Produção de Espermatóforos

Baseado nos resultados do Experimento 1, 6,0 V foi a voltagem decidida a ser utilizada para os experimentos seguintes, tendo como justificativa principal a taxa de sobrevivência final dos camarões.

De um total de 204 camarões utilizados, 84,31% produziram espermatóforos com um peso total médio de  $0,84 \pm 0,47$  mg, variando entre 0,10 e 2,10 mg. O CT médio dos machos de *M. acanthurus* foi de  $78,37 \pm 14,18$  mm, sendo o CC médio de  $24,54 \pm 3,98$  mm e o peso médio de  $10,63 \pm 4,70$  g. Pode-se verificar a presença de espermatozoides em 100% dos camarões que apresentaram espermatóforos.

Analisando as Figuras 5 A e B, verifica-se uma forte correlação ( $p < 0,05$ ) entre o CC e o peso do camarão, do que este último com o CT, fato este que pode estar relacionado às medidas do CC serem mais precisas e melhor representarem o tamanho do animal. A análise de regressão múltipla ( $R_{yy} = 0,87$ ) demonstrou que o peso do espermatóforo possui uma maior interação com o comprimento do cefalotórax ( $\rho = 0,0001$ ) e o peso do camarão ( $\rho < 0,0001$ ), que com o comprimento total ( $\rho = 0,0113$ ).

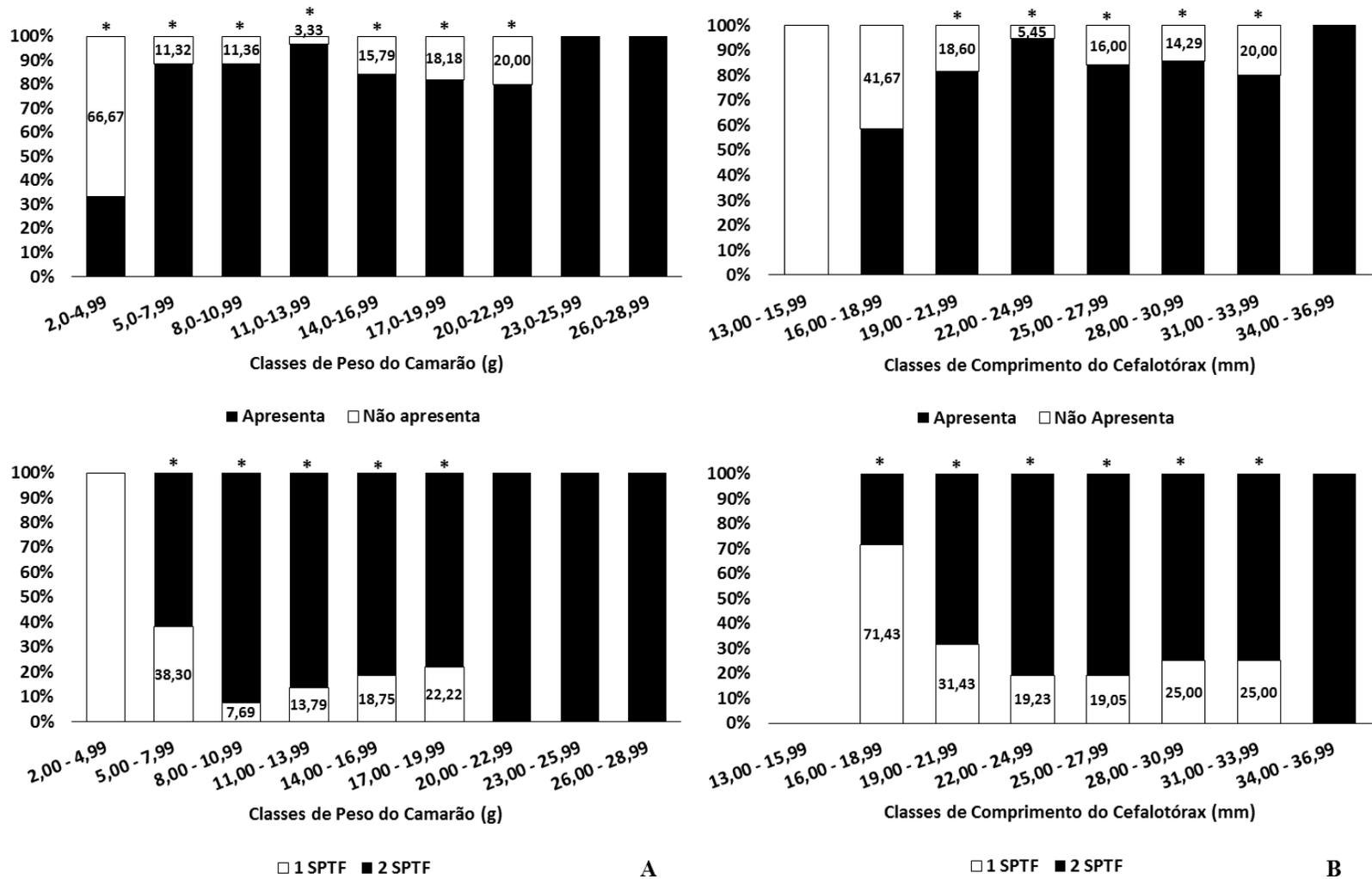


**Figura 5.** Correlação entre o peso do camarão com o comprimento do cefalotórax (A) e o comprimento total (B) de *Macrobrachium acanthurus*.

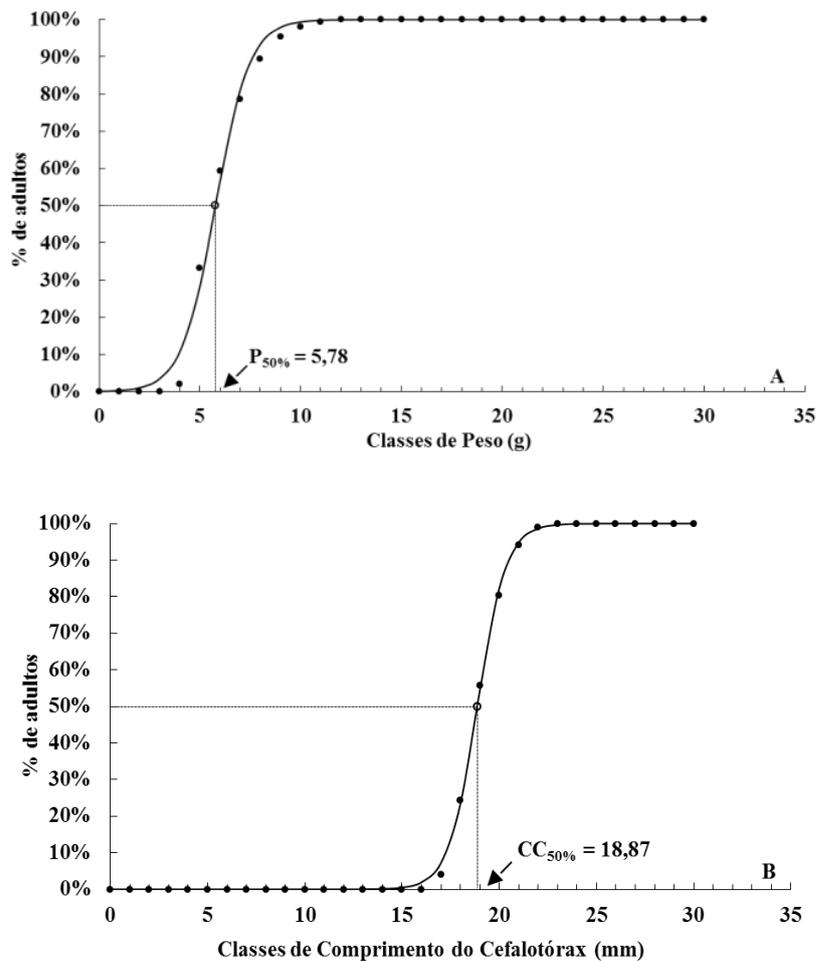
Levando-se em consideração a análise da produção de espermátóforos em relação ao peso do camarão (Figura 6A), pode-se verificar que machos a partir dos 2,00 g de peso vivo (PV) já apresentavam espermátóforos, entretanto, em menor proporção (33,33%) que aqueles com 5,00 g PV (88,68%).

Camarões com 5,00 g PV (61,70%) apresentaram uma maior quantidade máxima de espermátóforos produzidos em relação à primeira classe de peso, visto que 100% daqueles que produziram espermátóforos, apresentou apenas um. Estes resultados corroboram aqueles encontrados mediante análise no programa computacional Solver, revelando um  $P_{50\%} = 5,78$  g (Figura 7A).

Analisando-se a Figura 6B, onde a produção de espermátóforos está correlacionada com o CC, pode-se verificar que camarões com CC a partir de 16,00 mm já possuíam espermátóforos. Entretanto, foi a partir da classe de 19,00 mm, que a maioria dos animais (81,40%) começaram a apresentar dois espermátóforos (68,57%). As análises no Solver determinaram um comprimento de cefalotórax ( $CC_{50\%}$ ) de 18,87 mm (Figura 7B).

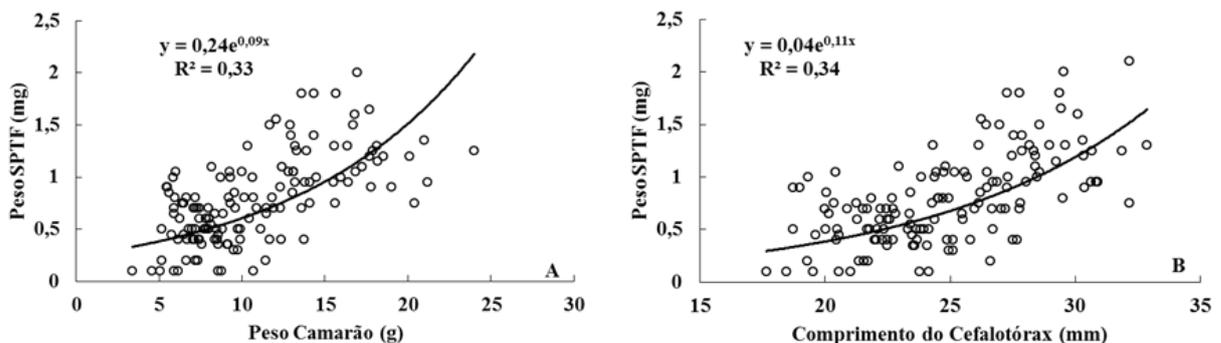


**Figura 6.** Distribuição de classes do peso (A) e do comprimento do cefalotórax (B) de *Macrobrachium acanthurus* em relação à presença ou ausência e a quantidade de espermatóforos (SPTF).



**Figura 7.** Função logística do ajuste da proporção do peso (A) e comprimento do cefalotórax (B) em que 50% do machos sexualmente maduros de *Macrobrachium acanthurus* produziram espermatóforos.

A correlação entre o peso do espermatóforo com o peso do camarão e o do primeiro com o CC (Figuras 8A e B) apresentaram-se fracas ( $p > 0,05$ ), podendo estar correlacionado a outros fatores que não estes analisados, verificando-se que camarões maiores, tanto em peso quanto em CC, não necessariamente produzem espermatóforos mais pesados.



**Figura 8.** Relação entre o peso (A) e o comprimento do cefalotórax (B) de *Macrobrachium acanthurus* com o peso médio do espermatóforo (SPTF).

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação da Voltagem

As condições ambientais a que os machos estão submetidas podem interferir diretamente na produção de espermátóforos. De acordo com Browdy (1992), em condições naturais, os fatores ambientais determinam a existência de épocas reprodutivas definidas, estimulando ou inibindo o processo reprodutivo de uma espécie em particular, uma vez que a maturação gonadal está sobre controle hormonal, que por sua vez é controlado pelos fatores ambientais (OGLE, 1992).

A temperatura média do presente estudo encontra-se dentro da faixa considerada ideal (25 a 30°C) para a alimentação e locomoção do *M. acanthurus* (BERNARDI, 1990). Díaz et al. (2002b) mencionam que esta espécie exibe uma ampla tolerância térmica, indicando sua capacidade de se adaptar às diferentes regiões, tendo importantes implicações para a aquicultura. Os teores de amônia e nitrito corroboram com aqueles reportados por Alves et al. (1981) para o cultivo de camarões do gênero *Macrobrachium*.

Jerry (2001) mencionou em seus estudos com *C. destructor*, que de cada 10 machos eletroestimulados no inverno, nove apresentaram extração parcial do espermátóforo e que quando estes animais foram submetidos a uma temperatura ideal e a um aumento do fotoperíodo, houve aumento na produção dos espermátóforos, sugerindo que os machos podem ser condicionados rapidamente para a reprodução em qualquer época do ano, mediante a manipulação ambiental.

Em relação ao período de extração, Alfaro-Montoya (2010) menciona que em peneídeos a renovação do espermátóforo pode estar relacionada com o ciclo de muda, ocorrendo ciclicamente a cada duas semanas, de acordo com o tamanho do macho, o acasalamento ou deterioração espermatofórica (melanização). Os machos do presente estudo produziram espermátóforos independente de realizar muda ou apresentarem melanização. Sabendo-se que a eletroestimulação fornece o material seminal tal como ocorre a fertilização na natureza (SANDIFER e LYNN, 1980), este fato pode ter induzido à produção de um novo espermátóforo.

A maior parte dos testes de eletroestimulação proporcionou a expulsão de dois espermátóforos, diferindo do reportado por Goldberg e Oshiro (2000) para *M. rosenbergii*, utilizando uma voltagem de 9,0V. Entretanto, estes autores aplicaram um único teste em animais recém despescados de viveiros de engorda e mencionaram, que o confinamento de machos pode acarretar a queda na qualidade do material genético dos camarões. No presente trabalho, a utilização de animais selvagens, possibilitou repetidas extrações de espermátóforos, sem que houvesse perda do percentual de espermatozoides viáveis ao longo de 60 dias.

Jerry (2001) menciona a extração de espermátóforos a cada dois dias em um período de uma semana em *C. destructor*, ressaltando que a capacidade de coletar vários espermátóforos de um mesmo macho, tem implicações diretas nos programas de melhoramento genético. Para *M. rosenbergii*, Baskar et al. (2004) mencionaram a possibilidade de reutilização do macho após um período de 24 horas e Harris e Sandifer (1986) obtiveram entre 81 e 100% de espermátóforos submetidos a diferentes repetições de estímulos de 4,0V ao longo de 29 dias. Estes autores, embora não tenham verificado decréscimo na taxa de fertilização de fêmeas, constataram diminuição significativa no volume do ejaculado, concluindo que a longo prazo, pode constituir fator limitante para eventuais inseminações.

Kooda-Cisco e Talbot (1983) observaram em *H. americanus*, uma regeneração do espermatóforo em um período de até duas semanas e em alguns casos, a extrusão foi parcial. Ao observarem este material em microscopia de transmissão eletrônica, Talbot e Chanmanon (1980) revelaram que o mesmo encontrava-se normal, com a membrana intacta e que os espermatozoides apresentavam-se morfológicamente normais após coloração com Tripán Blue e submetidos a reação acrossômica. Sandifer et al. (1984) relataram obter espermatóforos morfológicamente normais, após eletroestimularem camarões marinhos, ocorrendo fecundação e desenvolvimento embrionário normal após inseminação artificial.

Sandifer e Smith (1979) e Sandifer e Lynn (1980) obtiveram sucesso na inseminação de fêmeas de *M. rosenbergii* com o uso apenas de fragmentos do ejaculado. Uma vez que ainda não existem estudos quanto à quantidade mínima de espermatozoides necessários para a inseminação de uma fêmea, e levando-se em consideração o reportado pelos referidos autores, a obtenção de dois espermatóforos por macho em um processo de eletroestimulação, poderá gerar uma grande quantidade de fêmeas inseminadas. A este, associa-se ainda o fato de que não há diferença entre a produção espermática entre as metades direita e esquerda do macho, conforme encontrado no presente estudo e relatado por Wang et al. (1995) para *L. vannamei* e Ceballos-Vázquez (2003) para a mesma espécie em condições de cativeiro.

Em relação à quantidade de estímulos necessários para a extração do espermatóforo, Akarasanon et al. (2004) realizaram a aplicação de três a quatro estímulos de 9,0 V para sua extração em *M. rosenbergii*, obtendo posterior sucesso na inseminação artificial pós-criopreservação por 150 dias. Para esta mesma espécie, Baskar et al. (2004) utilizaram estímulos que variaram de 5,0 a 5,5 V durante 10 segundos, até o momento em que observaram contração muscular e posterior expulsão dos espermatóforos. Estes mesmos autores mencionaram que quando a voltagem aplicada foi de 6,0 V, as ampolas terminais apresentaram-se necrosadas, com uma coloração escura, diferentemente do observado no presente trabalho, quando estas se mantiveram íntegras e com a produção contínua de espermatóforos pelo macho.

Soundarapandian e Kannupandi (2000) e Graziani et al. (2003), visando estudos de hibridização entre duas espécies de *Macrobrachium*, eletroestimularam machos de *M. malcolmsonii* (Milne-Edwards, 1844) e *M. rosenbergii* com voltagens variando de 3,2 a 11,1 V e 3,0 a 7,5 V, respectivamente, aumentando a intensidade da corrente elétrica até a completa extração dos espermatóforos.

New (2005) mencionou que os camarões de água doce ainda não são domesticados e que a seleção e o melhoramento genético visando características desejáveis e os trabalhos de hibridização combinando características atraentes, como maior taxa de crescimento e maior susceptibilidade à salinidade durante o desenvolvimento larval poderão melhorar a viabilidade da produção destes camarões. Desta forma, a técnica de eletroestimulação pode ter um uso prático na triagem dos machos para inclusão em programas de melhoramento genético (JERRY, 2001).

Apesar de não apresentarem diferença significativa, a eletroestimulação com o uso de 6,0 V apresentou-se como a melhor opção em virtude da menor taxa de mortalidade. Além disto, pode-se concluir que esta é uma técnica simples e que pode ser executada rapidamente, consumindo não mais que alguns minutos por animal; quando for devidamente aplicada. O animal não sofre danos e pode ser reutilizado para uma nova coleção de espermatóforos. Como este material é um pacote natural para armazenagem de esperma, estes podem ser utilizados para a criação de um banco de espermas de camarões, tendo aplicação direta no desenvolvimento do cultivo de *Macrobrachium acanthurus*.

## 4.2 Efeito do Comprimento e Peso sobre a Produção de Espermatóforos

O crescente interesse na produção controlada de estoques de camarão em cativeiro para a reprodução tem aumentado no mundo. Entretanto, o desempenho reprodutivo do macho pode ser considerado como um dos principais inconvenientes da indústria camaronicultura, seja em espécies marinhas ou de água doce, sendo necessário um melhor entendimento da performance reprodutiva do macho, associado com a qualidade espermática em condições de cativeiro (DÍAZ et al., 2001; CEBALLOS-VÁZQUEZ et al., 2003; ALFARO-MONTOYA, 2010).

Albertoni et al. (2002b) demonstraram que o modelo exponencial de crescimento em peso, descreve com precisão a relação peso/comprimento para a fase adulta em *M. acanthurus*, corroborando com os dados aqui apresentados. Estes autores mencionam ainda que esta correlação é significativamente diferente entre machos e fêmeas, provavelmente devido ao dimorfismo sexual desta espécie (ANGER e MOREIRA, 1998; MANTELATTO e BARBOSA, 2005). Hayd e Anger (2013) encontraram esta mesma correlação para machos de *M. amazonicum*.

A grande variação de fecundidades encontradas em uma mesma população pode estar relacionada a várias características, entre elas a do macho, tais como idade/tamanho ou peso, e sua capacidade de produção de espermatóforos, uma vez que fêmeas grandes podem carregar pequenas quantidades de ovos e vice-versa e a quantidade de espermatozoides viáveis ser diferente para cada idade reprodutiva.

Albertoni et al. (2002a) mencionam que a fecundidade de *M. acanthurus* está diretamente relacionada com o tamanho e peso das fêmeas, relatando uma média de 8.437 ovos para animais que variaram de 79,34 a 107,46 mm de comprimento total. Müller et al. (1992) reportaram para animais desta mesma espécie, uma média de 1.932 ovos, para camarões variando de 48,00 a 84,70 mm de comprimento total e 1,20 a 7,58 g de peso. Estes autores ressaltam outros fatores que podem contribuir para esta amplitude na taxa de fecundidade encontrada, tais como temperatura, latitude, período reprodutivo, método de coleta, fatores genéticos, ações antrópicas, estratégias reprodutivas e efeitos nutricionais (VALENTI et al., 1989; TAMBURUS et al., 2012). Estes últimos autores relataram uma fecundidade média de 2.299 ovos para fêmeas de *M. acanthurus*, variando de 6,07 a 23,11 mm de comprimento de carapaça.

A determinação do tamanho da primeira maturação sexual ( $L_{50\%}$ ) é de fundamental importância para a utilização sustentável dos estoques pesqueiros, subsidiando medidas de ordenamento pesqueiro da espécie na área estudada (FONTELES-FILHO, 2011). Entretanto, estes dados são mais comumente encontrados estando relacionados às fêmeas, sendo reportado por Collart (1988) e Sampaio et al. (2007) para *M. amazonicum*; Antunes e Oshiro (2004) para *M. potiuna* e Cavalcante (2012) para *M. surinamicum* Holthuis, 1948.

Em machos, Freire et al. (2012) determinaram o  $CC_{50\%}$  para *M. amazonicum* capturados no Nordeste do Pará em 12,30 mm. Para esta mesma espécie, Hayd e Anger (2013) consideraram um  $CC_{50\%}$  de 2,50 mm como aquele do início da maturidade sexual. Cavalcante (2012) determinou um  $CC_{50\%}$  de 8,85 mm para machos de *M. surinamicum* e Mantelatto e Barbosa (2005), a partir de dados de crescimento relativo, indicaram que a maturidade sexual de *M. brasiliense* foi atingida entre 9,00 e 10,00 mm  $CC_{50\%}$ .

Segundo Anger e Moreira (1998), o tamanho com que uma população inicia a maturidade sexual é um parâmetro fundamental para se determinar o tempo de vida de uma espécie. Estes autores mencionam ainda, que o menor tamanho com que os machos apresentam o apêndice masculino, não necessariamente reflete o início da maturidade sexual, sendo este apenas um parâmetro para separação de sexos em estudos de estrutura populacional.

Ogle (1992) relata que não está totalmente claro, se a maturação do macho está relacionada com sua idade/tamanho, apesar de alguns estudos reportarem que animais maiores produzem significativamente maior quantidade de espermatozoides (ALFARO-MONTOYA, 1993; PRATOOMCHAT et al., 1993; DÍAZ et al., 2001). Entretanto, Ceballos-Vázquez et al. (2010) mencionam que a idade do camarão está intimamente associada com o tamanho e que, por este motivo, o peso está entre os principais critérios utilizados para a seleção de reprodutores, exceto no caso de animais selvagens, quando o tamanho é amplamente utilizado para selecionar reprodutores uma vez que a idade é desconhecida.

Peixoto et al. (2004) verificaram para *Farfantepenaeus paulensis* Latreille, 1817, que o peso dos espermatóforos aumentou com a idade do animal, não estando de acordo com os dados do presente estudo, pois o peso do espermatóforo variou independentemente do tamanho e peso dos camarões.

Os resultados aqui apresentados também discordam daqueles reportados por Ceballos-Vázquez et al. (2003) para *L. vannamei*, quanto à existência de correlação significativamente positiva ( $r=0,9$ ) entre os pesos corporal e do espermatóforo, encontrando uma maior proporção de espermatozoides anormais nos animais mais jovens. Estes mesmos autores concluem ainda, que a simples presença de espermatóforos não é um bom critério para a seleção de machos com propósitos reprodutivos, estando melhor relacionados com a idade do animal. Pratoomchat et al. (1993) também reportaram uma correlação positiva e significativa ( $r=0,73$ ) entre os pesos do espermatofoforo e do camarão *P. monodon*, sendo o mesmo resultado relatado por Díaz et al. (2001) para *P. muelleri* ( $r=0,99$ ).

## 5 CONCLUSÃO

Conclui-se portanto, que *Macrobrachium acanthurus* que possuam ao menos 5,00 g de peso vivo (PV) e 18,00 mm de comprimento de cefalotórax (CC) podem ser utilizados para estudos de reprodução e que estes parâmetros não interferem diretamente no peso dos espermatóforos produzidos.

Os resultados aqui apresentados podem contribuir para a seleção de reprodutores selvagens na formação de plantéis visando o cultivo em cativeiro, trabalhos de melhoramento genético e hibridização. Apesar de animais menores também terem produzido espermatóforos, há uma maior necessidade de aprofundamento destes estudos com camarões de água doce, afim de se verificar o sucesso do acasalamento e qualidade espermática destes animais quando pareados com fêmeas maiores, tanto em peso quanto em tamanho, uma vez que são variáveis correlacionáveis.

## **CAPÍTULO II**

### **EFEITOS DE TRÊS DIETAS SOBRE A PRODUÇÃO ESPERMÁTICA EM *Macrobrachium acanthurus***

## RESUMO

Biotecnologia é a aplicação de conhecimentos sobre os processos biológicos e propriedades dos seres vivos, entre elas as nutricionais. A necessidade de adquirir informações do que constitui os requerimentos nutricionais básicos para camarão de água doce e como estes influenciariam na produção de gametas, garantindo uma progênie de qualidade, leva a necessidade de novos estudos. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar a influência de três dietas sobre a sobrevivência espermática e suas implicações para o processo de criopreservação. Para tanto, 24 machos de *M. acanthurus* foram utilizados, sendo distribuídos ao acaso e igualmente entre os tratamentos. As dietas foram compostas por 100% alimento fresco (músculo de peixe e lula - 14% PB), 100% alimento seco (ração comercial - 50% PB) e uma mescla destas dietas contendo 30% PB. Os espermátóforos foram extraídos com eletroestimulação (6,0 V) a cada 15 dias, sendo o controle, aqueles espermátóforos obtidos dos camarões da natureza. Não houve diferença significativa entre as dietas quando comparado o peso dos espermátóforos. Apesar de alimentos frescos (100%) ter apresentado os melhores resultados para a sobrevivência de espermatozoides (80,13%), recomenda-se a utilização da alimentação fresca juntamente com a seca, mantendo desta forma as qualidades seminais para o processo de criopreservação. A falta de nutrientes essenciais para uma produção ideal de espermátóforos, a longo prazo, pode afetar a capacidade de resistir às crioinjúrias e a manutenção da produção de espermatozoides, uma vez que, a dieta mista não apresentou diferenças em relação ao controle.

**Palavras-chave:** Nutrição, Camarão de água doce, Reprodução, Sobrevivência espermática.

## RESUMEN

### **Efecto de tres dietas sobre la producción espermática en *Macrobrachium acanthurus*.**

Biotechnología es la aplicación de conocimientos sobre los procesos biológicos y las propiedades de los seres vivos, incluyendo la nutrición. La necesidad de obtener información de lo que constituye los requerimientos nutricionales básicos para el langostino y como influyen en la producción de gametos, asegurando una progenie de calidad, lleva a necesidad de nuevos estudios. El objetivo de este trabajo fue determinar la influencia de tres dietas sobre la supervivencia espermática y sus implicaciones en el proceso de criopreservación. Para eso, 24 machos de *M. acanthurus* fueron utilizados, distribuyéndose al azar y en igual número entre tratamientos. Las dietas fueron compuestas por 100% alimento fresco (músculo de pescado y calamar - 14% proteína cruda o PC), 100% alimento seco (dieta comercial - 50% PC) y una mezcla de estas dietas, conteniendo 30% PC. Los espermatozoides fueron extraídos con electroestimulación (6,0 V) cada 15 días y se consideró como el control a aquellos espermatozoides de la primera extracción que habían sido producidos en la naturaleza. No hubo diferencia significativa entre las dietas cuando se comparó el peso de los espermatozoides. La dieta de 100% alimento fresco presentó los mejores resultados de supervivencia espermática (80,13%). Sin embargo, la falta de nutrientes esenciales para una producción de espermatozoides sostenida a largo plazo capaz de resistir a las crioinjurias provocadas por la criopreservación, así como la observación de una mantención de la producción espermática por la dieta mezclada sin diferencia respecto del control, permiten recomendar la dieta compuesta por alimento fresco y seco que mantiene la calidad seminal requerida para la criopreservación.

**Palabras-clave:** Nutrición, Langostino, Reproducción, Supervivencia espermática.

## ABSTRACT

**Effects of three diets on the sperm production in *Macrobrachium acanthurus*.** Biotechnology is the knowledge application about biological processes and properties of living organisms, including nutrition. The need to acquire information of what constitutes the basic nutritional requirements for freshwater shrimp and how they influence the production of gametes, ensuring quality progeny, takes the need for new studies. The objective of this study was to determine the influence of three diets on sperm survival and their implications for the cryopreservation process. To achieve this purpose, a total of 24 cinnamon shrimp *M. acanthurus* males were used and distributed randomly and equally between treatments. The diets were composed of 100% fresh food (fish and squid muscle - 14% protein), 100% dry feed (commercial feed - 50% protein), and a mixture of these diets containing 30% protein. Spermatophores were extracted with electrical stimulation (6.0 V) every 15 days, and those obtained directly from nature were the control condition. No significant differences were found in spermatophore weights when compared between diets. Although fresh food (100%) showed the best results for sperm survival (80.13%), the lack of essential nutrients for optimal spermatophore production in the long term, their ability to resist cryoinjuries, and sperm production maintenance with a mixed diet showing no differences from control, led us to recommend fresh and dry feed to maintain seminal qualities for the cryopreservation process.

**Keywords:** Nutrition, Freshwater shrimp, Reproduction, Sperm survival.

## 1 INTRODUÇÃO

*Macrobrachium acanthurus* é uma espécie de camarão de água doce nativa do Brasil e que se encontra distribuído em todo o continente americano e nas Antilhas (FONSECA, 1995; CAMACHO et al., 1997; COELHO e RAMOS-PORTO, 1998; TORATI et al., 2011). Segundo Valenti et al. (1989) essa espécie possui potencial para o cultivo e é de considerável importância econômica, principalmente para as populações que o exploram de forma artesanal.

É um animal dióico, sendo o aparelho reprodutor do macho composto por testículos, vasos deferentes, saco espermatofórico e glândulas androgênicas (CARVALHO, 1980). Os espermatozoides são produzidos nos testículos, ocupando o centro de seus lóbulos; são pequenos e imóveis, apresentam a cabeça no formato de taça com a cromatina condensada em formato de “V”, provável peça intermediária curta e a cauda em forma de espinho (PAPA, 2003). Quando formados, os espermatozoides são descarregados nos vasos deferentes, estruturas glandulares, que apresentam várias funções tais como, transporte, manutenção de um ambiente propício para os gametas e a produção de uma capa protetora, formando o espermatóforo (DÍAZ et al., 2002a).

Para o crescimento da atividade de cultivo de camarão foram necessários investimentos na produção, manejo, nutrição, reprodução e mais recentemente, na melhoria genética das espécies. Manter camarões com baixa qualidade reprodutiva implica altos custos para os aquicultores. Para *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) e *Macrobrachium rosenbergii* De Man, 1879 técnicas para melhorar a qualidade reprodutiva tem sido estabelecida, como a avaliação de características da gônada ou moléculas relacionadas funcionalmente com o processo reprodutivo (ARCOS-ORTEGA, 2004). As biotecnologias de reprodução têm como principal objetivo, otimizar o uso dos gametas masculinos e femininos, e a produção de indivíduos de origem conhecida, dando prioridade à qualidade genética dos pais.

De acordo com Browdy (1992), Meunpol et al. (2005) e Shailender et al. (2012) as dietas e a qualidade dos reprodutores interferem diretamente na produção dos gametas e estes são responsáveis pela boa qualidade das larvas, sendo importante para o êxito do cultivo. Em geral, os efeitos nutricionais sobre a reprodução de camarões têm sido concentrados principalmente em fêmeas, no entanto, os machos podem estar contribuindo para um êxito limitado de algumas espécies nativas visando à criação em cativeiro (ADIYODI, 1985; BRAY e LAWRENCE, 1992; ALFARO e LOZANO, 1993; SAMUEL et al., 1999; DÍAZ et al., 2001).

Em machos, a qualidade espermática pode ser uma ferramenta para avaliar a eficiência da dieta para a reprodução e maturação de uma espécie, sendo estudada em *L. vannamei* por Perez-Velazquez et al. (2002), *L. setiferus* (Linnaeus, 1767) por Goimier et al. (2006), em *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) por Meunpol et al. (2005), Coman et al. (2007) e Leelatanawit et al. (2014), em *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante, 1967) por Braga et al. (2010) e em *P. merguensis* (De Man, 1888) por Memon et al. (2012). Em camarões de água doce, somente o estudo conduzido por Samuel et al. (1999) com *M. malcolmsonii* (Milne-Edwards, 1844) foi realizado.

O manejo alimentar para maturação de camarões inclui alimentos frescos, por exemplo, lulas, vermes, poliquetas, bivalves, caranguejos e peixes, com ou sem a adição de rações comerciais (BROWDY, 1992, 1998; HARRISON, 1997). Devido ao risco de transmissão de doenças, tecidos de crustáceos têm sido retirados das dietas de camarões em cativeiro, garantindo desta forma a biossegurança dos reprodutores e não influenciando

negativamente na performance reprodutiva (COMAN et al., 2007); assim, lulas, bivalves e peixes tem sido utilizados com mais frequência na alimentação deste animais.

De acordo com Harrison (1990) e Wouters et al. (2001), a importância destes ingredientes frescos dá-se em virtude de seus perfis nutricionais, em particular seus conteúdos e a proporção de certos aminoácidos, frações lipídicas e ácidos graxos essenciais, tais como araquidônico (20:4 n-6 ARA), eicosapentaenóico (20:5 n-3 EPA) e docosahexaenóico (22:6 n-3 DHA), que são de fácil digestão pelos crustáceos e reconhecidos por terem papéis metabólicos e fisiológicos significativos na reprodução de peneídeos (GLENCROSS, 2009). Para *M. borelli* (Nobili, 1896), González-Baró e Pollero (1998) relataram a incapacidade destes camarões sintetizarem ARA e EPA a partir de outros ácidos graxos, justificando uma suplementação dos mesmos na dieta.

Nesse contexto, o presente estudo visou determinar o efeito de três dietas sobre a produção espermática em *M. acanthurus*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 24 machos adultos de *Macrobrachium acanthurus* foram coletados em janeiro de 2014 no rio Sahy e conduzidos vivos à Estação de Biologia Marinha da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizada em Itacuruçá, Mangaratiba/RJ.

Os camarões foram individualizados em aquários com capacidade de 24 L, dotados de aeração constante, substrato arenoso e abrigos. Após um período de 24 horas, os animais foram medidos quanto aos seus comprimentos total e do cefalotórax com auxílio de um paquímetro digital (0,01 mm) e pesados com auxílio de uma balança analítica com precisão de 0,001g, bem como os espermátóforos. A renovação da água ocorreu a cada três dias e parâmetros como temperatura, pH e oxigênio dissolvido foram monitorados diariamente com auxílio de equipamento multiparamétrico; a amônia e o nitrito a cada dois dias, usando-se um kit colorimétrico.

Os animais foram distribuídos de forma, que cada tratamento contivesse camarões com pesos e tamanhos o mais homogêneo possível, totalizando oito animais por tratamento. Cada tratamento foi constituído por uma dieta (três no total), sendo compostas por uma ração comercial (alimento seco) para reprodutores de camarão marinho (níveis de garantia descritos na Tabela 1, Capítulo I) e dois alimentos frescos, a lula *Loligo sp.* e o músculo de corvina *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823), sendo a dieta T1 composta apenas pela ração. Para o preparo da dieta T2, a lula e o músculo do pescado foram adicionados na proporção de 1:1 e processados em moedor de carne até que se obtivesse uma massa homogênea. Na composição da dieta T3, foi utilizada uma parte da ração triturada e duas partes da massa obtida anteriormente (1:2), sendo ofertada na forma de “pellet”.

*Micropogonias furnieri* é uma espécie com ampla distribuição geográfica, encontrando-se da península de Yucatán (México) ao Golfo de San Matias (Argentina), apresentando em sua carne um teor de proteína que varia entre 18-19%, 1-2% de gordura e 940Kcal/Kg de energia e que, apesar dos grandes volumes de captura, alcançam pequenos valores de mercado (VASCONCELLOS e HAIMOVICI, 2006; BONACINA e QUEIROZ, 2007; TACO, 2011), o que justifica sua utilização como matéria-prima de baixo impacto nos custos da alimentação para reprodutores. De acordo com Crexi et al. (2009), a corvina apresenta um alto teor de ácido graxo poliinsaturado (61%), sendo os do grupo EPA e DHA representando 12% do total.

*Loligo sp.* distribui-se entre as águas costeiras do leste da América do Sul, a partir do norte da Argentina até o Rio de Janeiro/Brasil (BRAKONIECKI, 1984; ANDRIGUETO e HAIMOVICI, 1996). De acordo com Lapa-Guimarães et al. (2005), a captura da lula no Brasil é uma fonte de renda alternativa a pesca do camarão, resultando em produtos de baixa qualidade e valor de mercado. Entretanto, este pescado possui elevado valor nutricional, sendo rico em vitaminas, compostos glicerofosfóricos, carboidratos e proteínas de fácil digestão; contendo aproximadamente 14-15% de proteínas, 1-2% de lipídios e 5.610 Kcal/Kg de energia (LAPA-GUIMARÃES et al., 2005; SICCARDI III et al., 2006). Sikorsky e Kolodziejska (1986) mencionam que os lipídios do manto das lulas são constituídos principalmente por fosfolipídios e que são ricos em ácidos graxos poliinsaturados (58-71%), sendo os do grupo EPA e DHA representando cerca de 15%.

Após o preparo dos alimentos, uma amostra de 100g de cada dieta foi retirada e levada ao Laboratório de Bromatologia da UFRRJ, para análise da composição centesimal. As amostras foram pesadas e colocadas em estufa com ventilação forçada e após secagem, o material foi finamente moído, em gral de porcelana, passando em seguida às análises químicas, segundo as normas da AOAC (2000). Cada amostra, em triplicata, foi pesada e colocada em estufa a 105°C até obtenção de peso constante, quando então por diferença se

obteve o percentual de matéria seca (%MS). O teor de nitrogênio foi determinado pelo método do micro Kjeldahl, utilizando-se o fator 6,25 para conversão em proteína (%PB). Para a determinação da fração lipídica ou extrato etéreo (%EE), foi utilizado o método de Soxhlet. Para tanto, foram pesadas em torno de três a quatro gramas da amostra. O teor de cinzas ou a fração correspondente à matéria mineral (%MM) foi obtida através da calcinação em mufla, de aproximadamente dois gramas da amostra, a uma temperatura de 550°C, até peso constante. Para a análise de energia bruta (Kcal/Kg) foi utilizado 0,5g da amostra previamente processada, que foi colocada em bomba calorimétrica IKA, modelo 2000, isoperibólica, com precisão de 0,001°C (IKA, 2007).

A alimentação foi fornecida diariamente as 10 e 17 h, na base de 10% do peso vivo, imediatamente à extração dos primeiros espermátóforos, que foi conduzido conforme descrito no Capítulo I, realizada 24 h após o acondicionamento dos animais. Os primeiros espermátóforos compuseram o controle, que continham espermatozoides produzidos no ambiente natural. A extração ocorreu a cada 15 dias, totalizando quatro retiradas, que foram realizadas após o início do fornecimento da alimentação em cativeiro, quando os camarões também foram pesados. Os camarões só foram mensurados novamente ao final do período experimental, com 60 dias após alojamento nos aquários. Os espermátóforos foram retirados de todos os animais, entretanto apenas seis foram utilizados para a contagem da sobrevivência espermática, com o uso de esfregaço de sêmen corado com eosina-nigrosina (Capítulo I), sendo que cada espermátóforo constituiu uma unidade experimental.

Antes de cada procedimento de extração, os seis animais que forneciam espermátóforos para a análise da sobrevivência espermática foram sorteados, cabendo aos demais apenas a extração para que todos mantivessem a mesma condição experimental. Somente um espermátóforo por camarão foi aproveitado e quando ocorria a extração de dois, um era escolhido ao acaso. Os outros dois camarões que não compuseram uma rodada de extração, obrigatoriamente sediam material seminal para a extração subsequente, de forma com que todos os animais contribuíssem para a contagem de sobrevivência espermática.

Os dados foram submetidos ao teste Shapiro-wilk para avaliação da normalidade e Levene para homocedasticidade. Para verificar se houve diferença significativa foi aplicada a análise de variância (Anova On-Way) e teste de Tukey, a 5% de significância.

### 3 RESULTADOS

A variação média dos parâmetros ambientais para cada uma das dietas ofertadas encontra-se na Tabela 1. Embora todos os animais tivessem recebido as mesmas condições, no tratamento T3 a temperatura e a amônia apresentaram diferenças significativas em relação ao tratamento T1 e os teores de nitrito foram maiores ( $p < 0,05$ ) que aqueles verificados para os camarões alimentados com as dietas T1 e T2, que não apresentaram diferença ( $p > 0,05$ ) entre nenhum dos parâmetros analisados.

**Tabela 1.** Variação média dos parâmetros ambientais em relação às dietas fornecidas.

Dietas	T°C	pH	O <sub>2</sub> D mg/L	NH <sub>3</sub> ppm	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ppm
T1	23,57 ± 1,35 <sup>a</sup>	7,28 ± 0,50 <sup>a</sup>	7,50 ± 0,58 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,90 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,30 <sup>a</sup>
T2	23,08 ± 1,39 <sup>ab</sup>	7,09 ± 0,51 <sup>a</sup>	7,46 ± 0,40 <sup>a</sup>	0,89 ± 0,90 <sup>ab</sup>	0,06 ± 0,22 <sup>a</sup>
T3	22,77 ± 1,41 <sup>b</sup>	7,03 ± 0,51 <sup>a</sup>	7,32 ± 0,48 <sup>a</sup>	1,27 ± 1,10 <sup>b</sup>	0,32 ± 0,73 <sup>b</sup>

Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem significativamente ( $p > 0,05$ ) entre si. T1: ração comercial; T2: peixe + lula e T3: ração + peixe + lula.

Os níveis de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE) e energia estão apresentados na Tabela 2. A ração comercial (dieta T1) foi aquela que apresentou os maiores teores de proteína, minerais e extrato etéreo, entretanto com o menor nível de energia. A mistura de peixe e lula (T2) foi a dieta que apresentou os menores teores de MS, PB, MM e EE, entretanto, foi a que forneceu o maior valor energético. A dieta T3 foi a que apresentou os níveis intermediários de nutrientes entre as dietas, refletindo a mistura realizada entre os alimentos seco e fresco.

Em relação aos camarões, no tratamento T1, os animais apresentaram um crescimento de 3,91% em relação ao comprimento do cefalotórax (24,02 ± 4,60 mm inicial; 24,96 ± 3,78 mm final); para os animais do tratamento T2, a taxa de crescimento foi de 0,94% (23,49 ± 2,91 mm inicial; 23,71 ± 2,74 mm final) e para os camarões do tratamento T3 foi de 8,45% (22,14 ± 2,21 mm inicial; 24,01 ± 2,22 mm final).

Na Tabela 3 encontra-se o efeito da alimentação sobre os parâmetros biométricos aferidos ao longo do período experimental. Em relação ao peso dos camarões e ao peso dos espermatóforos, não foi verificada diferença significativa entre e dentre os tratamentos.

Em relação a sobrevivência espermática, o tratamento T2 foi aquele que apresentou o melhor resultado ( $p < 0,05$ ), obtendo uma média de 80,13%, apesar de não diferir significativamente de T1 (Tabela 3). Entretanto, se considerarmos apenas as quatro coletas em cativeiro, o aumento da sobrevivência foi de 19,40% (T2) em relação ao controle, enquanto os demais tratamentos obtiveram um decréscimo de 6,06% (T1) e 5,71% (T3).

100% dos animais produziram dois espermatóforos durante as coletas. Somente foi observada mortalidade ao final do período experimental, sendo de 25% (dois camarões) para cada tratamento.

**Tabela 2.** Composição centesimal, com base na matéria seca, das dietas experimentais fornecidas aos camarões *M. acanthurus* e seus níveis de energia bruta.

	%				Kcal Kg <sup>-1</sup>
	MS	PB	MM	EE	Energia
T1 Ração comercial	88,55 ± 0,55	50,34 ± 0,90	8,56 ± 0,00	10,94 ± 0,01	4.866
T2 Peixe + lula	16,74 ± 0,04	14,51 ± 0,07	1,06 ± 0,01	1,22 ± 0,04	5.281
T3 Ração + peixe + lula	47,81 ± 0,21	30,32 ± 0,09	4,27 ± 0,04	5,52 ± 0,07	5.140

Matéria seca (MS), proteína bruta (PB), matéria mineral (MM) e extrato etéreo (EE).

**Tabela 3.** Influência da alimentação fornecida por 60 dias sobre os pesos do camarão, do espermatóforo e sobrevivência espermática em *Macrobrachium acanthurus*.

Parâmetros	Tratamentos	Controle	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias	Média
Peso do camarão (g)	T1	10,62 ± 1,92 <sup>aA</sup>	10,55 ± 2,19 <sup>aA</sup>	10,61 ± 2,22 <sup>aA</sup>	11,42 ± 2,30 <sup>aA</sup>	12,01 ± 2,54 <sup>aA</sup>	11,04 ± 2,24 <sup>a</sup>
	T2	10,09 ± 1,25 <sup>aA</sup>	10,37 ± 1,19 <sup>aA</sup>	10,44 ± 1,17 <sup>aA</sup>	10,43 ± 1,33 <sup>aA</sup>	10,08 ± 1,48 <sup>aA</sup>	10,28 ± 1,28 <sup>a</sup>
	T3	7,67 ± 0,60 <sup>aA</sup>	8,52 ± 0,97 <sup>aA</sup>	8,65 ± 0,88 <sup>aA</sup>	9,36 ± 0,89 <sup>aA</sup>	9,69 ± 1,38 <sup>aA</sup>	8,78 ± 0,94 <sup>a</sup>
Peso do espermatóforo (mg)	T1	1,15 ± 0,14 <sup>aA</sup>	0,82 ± 0,26 <sup>aA</sup>	1,08 ± 0,31 <sup>aA</sup>	1,30 ± 0,23 <sup>aA</sup>	1,00 ± 0,33 <sup>aA</sup>	1,07 ± 0,25 <sup>a</sup>
	T2	1,38 ± 0,29 <sup>aA</sup>	1,22 ± 0,29 <sup>aA</sup>	1,40 ± 0,35 <sup>aA</sup>	1,10 ± 0,18 <sup>aA</sup>	0,80 ± 0,28 <sup>aA</sup>	1,18 ± 0,28 <sup>a</sup>
	T3	1,05 ± 0,22 <sup>aA</sup>	1,37 ± 0,17 <sup>aA</sup>	0,87 ± 0,33 <sup>aA</sup>	1,10 ± 0,18 <sup>aA</sup>	1,00 ± 0,22 <sup>aA</sup>	1,08 ± 0,22 <sup>a</sup>
Sobrevivência espermática (%)	T1	80,38 ± 5,80 <sup>aA</sup>	67,48 ± 6,82 <sup>aA</sup>	68,50 ± 8,12 <sup>aA</sup>	85,07 ± 2,95 <sup>aA</sup>	80,97 ± 4,7 <sup>aA</sup>	76,48 ± 5,68 <sup>ab</sup>
	T2	69,36 ± 3,87 <sup>aA</sup>	76,43 ± 4,90 <sup>aA</sup>	81,02 ± 4,97 <sup>aAB</sup>	94,36 ± 3,30 <sup>aB</sup>	79,45 ± 6,21 <sup>aAB</sup>	80,13 ± 4,65 <sup>a</sup>
	T3	76,71 ± 3,91 <sup>aA</sup>	65,35 ± 6,76 <sup>aA</sup>	75,74 ± 5,29 <sup>aA</sup>	86,17 ± 4,47 <sup>aA</sup>	62,05 ± 5,45 <sup>aB</sup>	73,20 ± 5,18 <sup>b</sup>

Médias seguidas de letras iguais nas linhas (maiúsculas) e colunas (minúsculas) não diferem significativamente ( $p > 0,05$ ) entre si. T1: ração; T2: peixe + lula e T3: ração + peixe + lula. Os dados estão expressos por média ± erro padrão.

## 4 DISCUSSÃO

Apesar de *M. acanthurus* apresentar uma reprodução contínua, de acordo com Tamburus et al. (2012), seus picos reprodutivos ocorrem entre dezembro e janeiro na região Sudeste do Brasil, sendo esta uma característica comum aos camarões do gênero *Macrobrachium* (VALENTI et al., 1986). O referido período pode ser considerado ideal para estudos com reprodutores, uma vez que as estações do ano influenciam o ciclo reprodutivo dos crustáceos, sendo observadas diferenças no trato reprodutivo (BUGNOT e LÓPEZ GRECO, 2009; BAMBOZZI, 2013). De acordo com Browdy (1992) e Ogle (1992), em condições naturais, os fatores ambientais é que determinam a existência de épocas reprodutivas definidas, estimulando ou inibindo o processo reprodutivo de uma espécie em particular, uma vez que a maturação gonadal está sobre controle hormonal, que por sua vez é controlado pelos fatores ambientais.

De acordo com Bray et al. (1985), Pascual et al. (1998) e Perez-Velazquez et al. (2001), as temperaturas das águas em ambientes de cultivo são sempre superiores às do ambiente natural e essas maiores temperaturas estariam afetando a sobrevivência espermiática, que independente deste fator, já variam fortemente entre indivíduos de uma mesma população. O mesmo foi reportado por Bugnot e López Greco (2009) para a lagosta *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1898), onde os testículos dos machos adultos expostos a altas temperaturas tenderam a diminuir, apresentando uma significativa diminuição espermiática.

Bernardi (1990) determinou que a faixa de temperatura considerada ideal para a alimentação e locomoção do *M. acanthurus* varia de 25 a 30°C. Entretanto, as médias desta encontrada no presente estudo estão de acordo com a amplitude térmica determinada por Díaz et al. (2002b), que mencionaram uma ampla tolerância (15 a 38°C) para esta espécie, indicando sua capacidade de se adaptar às diferentes regiões (TORATI et al., 2011), suportando as condições impostas pelo meio sem que comprometessem a produção espermiática. Desta forma, pode-se deduzir que as variações térmicas impostas pelo meio aos animais durante o período experimental não comprometeram o processo de produção espermiática.

De acordo com Elmor et al. (1981) e Gasca-Leyva et al. (1991), o consumo de oxigênio em *M. acanthurus* é inversamente proporcional ao peso do animal e que animais maiores necessitam menores concentrações de oxigênio na água. Segundo Alves et al. (1981), o ideal é que a concentração deste gás dissolvido na água seja superior a 5 mg/L, corroborando com os valores reportados no presente estudo, bem como os teores de amônio e nitrito (<1,5 ppm), apesar da diferença encontrada entre os tratamentos. A baixa qualidade da água, o que não foi constatado no presente estudo, foi reportada por Cavalli et al. (1998), Perez-Velazquez et al. (2001) e Pascual et al. (2003) como sendo um fator que pode interferir na reprodução.

Sabe-se que em crustáceos o crescimento é contínuo, mesmo nos animais em período reprodutivo, embora num ritmo mais lento que nas primeiras fases da vida (ALBERTONI et al., 2002b). Entretanto, de acordo com D'Abramo e Sheen (1993), os ácidos graxos também são responsáveis pelo crescimento em camarões de água doce, o que poderia justificar o maior crescimento dos animais do T3, juntamente com a ração comercial pelo aporte de carboidratos e proteínas, apesar de não ter sido verificada diferença significativa entre os demais tratamentos.

Papa (2003) mencionou em seus estudos com machos de *M. amazonicum*, que dietas contendo maiores quantidades de colesterol inibiram o crescimento corpóreo e testicular do camarão, conforme relatado para outras espécies de decápodos, o que poderia vir a justificar os resultados reportados para o T2, onde os animais tiveram o menor crescimento apesar da

maior sobrevivência espermática. Ribeiro et al. (2012) mencionaram que os níveis de lipídios podem ser baixos em uma dieta, se os mesmos fornecerem uma quantidade suficiente de ácidos graxos, sendo o requerimento destes distinto entre as espécies de crustáceos (GONZÁLEZ-BARÓ e POLLERO, 1998).

De acordo com Gastelú et al. (2011), os lipídios são considerados como importantes fontes de energia aos crustáceos, entretanto, dietas contendo altos níveis desse composto podem não conter quantidades de carboidratos como fonte de glicose, que é ainda mais necessária quando ocorre por exemplo a síntese de quitina, justificando a presença de uma dieta equilibrada. Segundo os mesmos autores, a influência dos alimentos lipídico e protéico, induzindo altos níveis de glicose na hemolinfa a uma temperatura de 20°C, pode ser devido a deficiência de carboidratos nos camarões, que são supridas por proteínas e lipídios, pois os esqueletos de carbono dos aminoácidos não essenciais asseguram a formação de glicose, bem como dos ácidos graxos.

Além de sua importância para a produção de quitina, os carboidratos, bem como as glicoproteínas estão presentes no fluido seminal, sendo essenciais para o processo de maturação e manutenção da viabilidade espermática (DOUGHERTY et al., 1986, JEYALACTUMIE e SUBRAMONIAM, 1989; POLJAROEN et al., 2010; ZARA et al., 2012; BAMBOZZI, 2013). Jeyalectumie e Subramonian (1989) mencionaram a redução dos níveis deste nutriente em espermatozoides preservados a -4°C, indicando seu consumo mesmo a baixas temperaturas. Desta forma, baixas concentrações deste fluido poderiam comprometer a sobrevivência espermática durante os processos de fecundação ou criopreservação, uma vez que não auxiliariam contra as injúrias provocadas pelo meio externo, bem como no fornecimento de energia aos espermatozoides.

Estudos anteriores com camarões marinhos demonstraram que o peso do espermatóforo não depende da quantidade de espermatozoides nele contido (DÍAZ et al., 2001), mas pode ser associado com a idade do camarão, peso do organismo e dos componentes estruturais (ALFARO-MONTOYA, 1993). Assim, a diminuição de peso dos espermatóforos encontrados no T2 poderiam estar relacionados a uma carência de carboidratos na dieta fornecida a base de peixe e lula, embora não tenham sido encontradas diferenças significativas em relação ao peso médio dos demais tratamentos. Entretanto, se ressalta a necessidade de pesquisas que comprovem esta teoria.

De acordo com Chanmungam et al. (1983), nos tecidos dos camarões de água doce predominam os ácidos graxos ômega-6, provenientes a partir de sua dieta natural (CAVALLI et al., 1999). Estes autores reportaram também que um incremento do nível dietético de ômega-6 promoveu um aumento na taxa de fecundidade em fêmeas de *M. rosenbergii* e que considerando que as gônadas são compostas por uma importante fração lipídica e que os camarões possuem uma reduzida capacidade de armazenamento hepático deste nutriente, não é de estranhar que os reprodutores requeiram um maior aporte do mesmo.

Meunpol et al. (2005) encontraram uma maior concentração de ômega-6 nos tecidos reprodutivos de machos de *P. monodon*, relatando que aqueles que apresentaram maiores concentrações deste ácido graxo no espermatóforo, exibiram uma maior quantidade de espermatozoides. O mesmo pode ser reportado por Leelatanawit et al. (2014), quando alimentaram esta mesma espécie com poliquetos, ricos em ácidos graxos (ARA, EPA e DHA), também encontraram um aumento de peso e tamanho do camarão a partir da terceira semana, bem como do peso do espermatóforo.

De acordo com Leat et al. (1983), a redução nas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados em experimentos com ratos, mostrou uma degeneração dos túbulos seminíferos com progressiva diminuição de células germinais e ausência de espermatozoides. Harlioğlu et al. (2013) mencionaram que houve um aumento progressivo na quantidade de

espermatozoides do lagostim *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) com a adição de diferentes níveis de ácidos graxos poliinsaturados n-3.

Memon et al. (2012) e Shailender et al. (2012) encontraram maior sobrevivência espermática utilizando poliquetos e lulas para *P. merguensis* e *P. monodon* respectivamente, sendo este último alimento considerado mais eficiente; estes autores ainda mencionaram que a inclusão de alimentos frescos durante o processo de maturação dos machos é importante para reduzir os efeitos da degeneração natural do espermátóforo, conforme já relatado em outros peneídeos. Além deste fator, segundo Braga et al. (2010), *F. paulensis* alimentados somente com dietas comerciais apresentaram maior ausência de material seminal e hiperglicemia na hemolinfa, não sendo portanto recomendado e sim dietas compostas por um mix entre alimentos fresco e seco.

Os ácidos graxos poliinsaturados contribuem para a fluidez e flexibilidade da membrana plasmática e apesar de sua importância para a reprodução, a quantificação destes em espermátóforos ou espermatozoides de crustáceos carece de pesquisa científica, relacionando-os apenas ao aumento da produção espermática, conforme até aqui relatado. De acordo com Mazur (1984) e Parks e Graham (1992), a nível molecular, mudanças na organização da membrana plasmática tais como alterações na composição lipídica, podem implicar na perda de sua permeabilidade.

Fonseca (2012) menciona que a presença de altas concentrações destes ácidos graxos dentro das frações lipídicas dos espermatozoides torna-os altamente susceptíveis a peroxidação, com consequentes riscos de danos à estrutura celular, entre os quais podem ser citadas: alterações no metabolismo e liberação de componentes intracelulares; compactação e deleção no DNA; danifica a integridade da membrana plasmática; depleção de adenosina trifosfato e alteração mitocondrial (BECONI et al., 1993; AGARWAL et al., 2005; BAUMBER et al., 2003; BROUWERS e GADELLA, 2003).

Uma vez que a composição lipídica é alterada durante o processo de criopreservação, o que pode estar ligado ao aumento da peroxidação lipídica, associada à técnica de congelamento ou ao estresse térmico provocado pelo processo, pela indução de mudanças nos fosfolipídios e organização do colesterol que modificariam a homeostase celular, a membrana plasmática aumenta sua hidrofobicidade como um mecanismo para adquirir resistência às criolesões (CURRY e WATSON, 1994; CHAKRABARTY et al., 2007; BARBAS e MASCARENHAS, 2009; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2012; NASIRI et al., 2012). Desta forma, os crioprotetores intracelulares mais comumente utilizados nos processos de congelamento de semen de crustáceos (metanol, glicerol, etilenoglicol e dimetilsulfóxido) poderiam não estar atuando adequadamente, deixando as células espermáticas desprotegidas, em virtude da tensão formada na superfície celular, que impediria a diminuição do ponto crioscópico interno, resultando nos inúmeros casos de insucesso nos processos de criopreservação de camarões descritos na literatura.

De acordo com Watson (1995), os crioprotetores intracelulares atuam por meio de suas propriedades coligativas, de maneira que uma quantidade maior de água permanecerá no estado líquido sob baixas temperaturas, diminuindo a concentração intracelular dos solutos, propiciando um ambiente menos deletério à célula espermática durante o congelamento. Igualmente, Siqueira (2004) e Muller et al. (2008) mencionaram que o conteúdo de colesterol também influenciaria a fluidez da membrana por tornar a camada bilipídica menos deformável e consequentemente diminuiria a permeabilidade da mesma a pequenas moléculas hidrossolúveis.

Baumber et al. (2003) menciona que o plasma seminal é uma proteção antioxidante natural e que sua remoção durante o procedimento para a criopreservação em mamíferos, expõe a célula a uma peroxidação lipídica. Desta forma, assim como uma dieta contendo apenas alimentos frescos, rica em ácidos graxos, pode proporcionar comprovadas melhoras na

quantidade e na sobrevivência espermática, poderia estar contribuindo para a morte celular durante o processo de criopreservação em virtude do menor aporte de nutrientes necessários à produção do plasma seminal, caracterizado pela queda de peso verificada nos espermatóforos (T2), além das possíveis alterações nas frações lipídicas da membrana celular.

De acordo com Albertoni et al. (2003) e García-Guerrero et al. (2013), em função dos diversos estudos realizados com camarões do gênero *Macrobrachium*, é sabido que os animais adultos são preferencialmente carnívoros e detritívoros, e que aceitem todo tipo de alimento com certo conteúdo de proteína animal, podendo ser alimentados em cativeiro com rações comerciais. Segundo Wouters et al. (2000, 2002), Perez-Velazquez et al. (2002, 2003) e Meunpol et al. (2005), o uso destas dietas se faz vantajoso porque são fáceis de gerenciar e estocar, não requerem preparação e oferecem menor risco de contaminação e apresentam menor impacto sobre a qualidade da água; entretanto, quando esta é ofertada unicamente durante o período de maturação, os resultados da produção quando comparados aos do alimento fresco não são satisfatórios, sendo indicado seu uso em um máximo de 50% nas dietas para reprodutores de peneídeos. O mesmo foi relatado por Samuel et al. (1999) para machos de *M. malcolmsonii*, que sugeriram o uso de alimento fresco e dietas comerciais.

No presente estudo, a dieta contendo 30% de ração comercial e 60% de alimento fresco não apresentou resultados satisfatórios quanto à sobrevivência espermática. Entretanto, Perez-Velazquez et al. (2003) sugerem que pelo menos 25% da dieta de maturação devem ser substituídas por uma ração, visando conter uma oferta de vitaminas e minerais (Bray e Lawrence, 1992), uma vez que estes aparentemente evitam o catabolismo de ARA e EPA, conforme mencionado por González-Baro e Pollero (1998) em *M. borelli*.

Perez-Velazquez et al. (2002, 2003) mencionam que quando os animais foram alimentados com 100% de alimento fresco, houve perda de peso em *L. vannamei* e um decréscimo na contagem espermática, corroborando em parte com os resultados do presente estudo. Entretanto, maiores investigações são necessárias para desvendar o papel específico de cada nutriente sobre a qualidade reprodutiva do macho, a exemplo do reportado por Braga et al. (2013b). Estes autores mencionam que embora fêmeas possam requerer suplementação de carotenóides, devido à necessidade de reserva de pigmentos nos ovos, para machos de *F. paulensis*, os carotenóides contidos nos alimentos frescos são suficientes para a reprodução.

Entre os compostos orgânicos alimentares, tem sido sugerido que a proteína está mais associada com a qualidade de espermatóforos e espermatozoides, que os lipídios ou carboidratos, uma vez que a proteína está relacionada com a formação do espinho dos espermatozoides, essencial durante o processo de fertilização dos Dendrobranchiata (SÁNCHEZ et al., 2001; GOIMIER et al., 2006; BRAGA et al., 2013a).

Segundo Bartlett e Enkerlin (1983), *M. rosenbergii* podem ser criados utilizando-se uma dieta com 14% de proteína, garantindo seu normal crescimento. Entretanto, Chowdhury et al. (2008) mencionaram que o requerimento estimado de proteína para pós-larvas desta espécie é de 35% e Luna et al. (2007) sugeriram 25%, ressaltando-se a falta de um consenso sobre a quantidade de proteína considerada ideal para camarões de água doce, especificamente quando se tratam de reprodutores.

Em seus estudos com machos de *L. setiferus*, Goimier et al. (2006), sugere que a proteína dietética em excesso, pode desencadear um estresse no animal, provocando a perda da qualidade espermática, assim como o manejo em cativeiro (LEUNG-TRUJILLO e LAWRENCE, 1987; ALFARO-MONTOYA, 1993). Os maiores teores de proteína aumentam a concentração de hemócitos no camarão, preparando-o para uma defesa imunológica. Desta forma, se o animal for então estressado por uma quantidade de amônia interna, uma reação imunológica pode ser ativada como resposta ao estresse, afetando várias funções fisiológicas, incluindo a produção e a qualidade dos espermatozoides, seguindo o mesmo mecanismo descrito quando o camarão é submetido a temperaturas extremas (PASCUAL et al., 2003; GOIMIER

et al., 2006). Entretanto, estes fatores parecem não ter interferido no presente estudo, sendo o mesmo reportado por Memon et al. (2012), visto que a produção de espermatóforo se manteve ao longo do período experimental, sem apresentar diferença significativa em relação ao controle para a dieta com o maior teor de proteína.

## 5 CONCLUSÃO

Conclui-se, portanto que, os alimentos frescos promovem uma maior sobrevivência espermática, além de um já reconhecido aumento da quantidade de espermatozoides produzidos. Por outro lado, há falta de informações sobre uma dieta comercial equilibrada para o desenvolvimento pleno do organismo, justificando até o presente momento o uso destas dietas suplementadas com o alimento fresco, sendo ainda a alimentação mais eficiente.

A mescla destas duas dietas (T3), proporcionou um maior crescimento aos animais, não alterou significativamente o peso dos espermatóforos, bem como da sobrevivência espermática em relação às obtidas diretamente do ambiente natural.

Entretanto, ressalta-se a necessidade de maiores estudos em relação aos efeitos nutricionais sobre a produção espermática e suas implicações nos processos de criopreservação e inseminação artificial.

## **CAPÍTULO III**

### **TESTE DE TOXICIDADE, METODOLOGIAS DE CONGELAMENTO E REFRIGERAÇÃO EM SÊMEN DE *Macrobrachium acanthurus***

## RESUMO

O processo de criopreservação de espécies nativas, seja para resguardar o patrimônio genético ou induzir a uma maior produção animal pelo processo de inseminação artificial, têm sido utilizado em diversos organismos aquáticos, entretanto, sem muito sucesso com camarões de água doce. Desta forma, este trabalho teve como objetivo iniciar os estudos com *M. acanthurus* realizando testes de toxicidade e verificando duas metodologias de criopreservação. A primeira etapa deste trabalho testou a toxicidade de quatro crioprotetores (etilenoglicol, metanol, glicerol e dimetilsulfóxido) em espermatozoides de *Macrobrachium acanthurus* durante 10 e 20 min nas concentrações de 10 e 20%. A segunda etapa foi realizada a criopreservação aplicando o crioprotetor com menor grau de toxicidade, testando dois mecanismos de congelamento, um automatizado (protocolos A e B) e outro convencional (protocolos C e D), durante 24 horas. O protocolo A apresentou velocidade de resfriamento de  $0,5^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até alcançar  $-32^{\circ}\text{C}$ , partindo de uma temperatura de  $-6^{\circ}\text{C}$  e idem o protocolo B, com a diferença de partir de uma temperatura ambiente; os protocolos C e D apresentaram uma velocidade de resfriamento de 2 e  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , respectivamente, sendo as palhetas transferidas ao nitrogênio líquido. A terceira etapa foi verificar o tempo de vida do espermatozoide quando refrigerado a  $5^{\circ}\text{C}$  durante 10 dias. A viabilidade espermática foi avaliada por meio do esfregaço de sêmen com eosina-nigrosina. Os crioprotetores que se apresentaram menos tóxicos foram o glicerol 10 e 20% e metanol 10%, num tempo de equilíbrio de 10 minutos. A melhor velocidade de congelamento foi a de  $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$  para glicerol 10%, com 21,83% de sobrevivência espermática. Quanto à refrigeração dos espermatóforos, recomenda-se até três dias, com uma sobrevivência de 35,26%.

**Palavras-chave:** Camarão de água doce, Criopreservação, Crioprotetores, Glicerol, Metanol.

## RESUMEN

**Pruebas de toxicidad, metodologías de congelamiento y refrigeración de semen de *Macrobrachium acanthurus*.** El proceso de criopreservación de especies nativas, sea para salvaguardar el patrimonio genético o inducir aumento de la producción animal mediante proceso de inseminación artificial, se han utilizado en varios organismos acuáticos, sin embargo, sin mucho éxito en langostinos. Este estudio tuvo como objetivo empezar estudios con *M. acanthurus* realizando pruebas de toxicidad y verificando dos métodos de criopreservación. En la primera fase de este trabajo, se realizaron pruebas de toxicidad para cuatro crioprotectores (etilenoglicol, metanol, glicerol y dimetil sulfoxido) en espermatozoides de *Macrobrachium acanthurus* durante 10 y 20 min en las concentraciones de 10 y 20%. En la segunda fase se realizó la criopreservación utilizando el crioprotector de menor grado de toxicidad, ensayando dos mecanismos de congelamiento, uno automatizado (protocolos A y B) y otro convencional (protocolos C y D), por 24 horas. El protocolo A presentó una velocidad de refrigeración de  $0,5^{\circ}\text{C min}^{-1}$  hasta llegar a  $-32^{\circ}\text{C}$ , iniciando a una temperatura de  $-6^{\circ}\text{C}$ ; ocurriendo lo mismo para el protocolo B, partiendo de la temperatura ambiente. Los protocolos C y D presentaron una velocidad de refrigeración de 2 y  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$  respectivamente, siendo las paletas colocadas en nitrógeno líquido. La tercera etapa consistió en verificar el tiempo de supervivencia de los espermatozoides refrigerados a  $5^{\circ}\text{C}$  por 10 días. La viabilidad espermática fue evaluada por medio de un frotis coloreado de semen con eosina-nigrosina. Los crioprotectores que se presentaron con menor grado de toxicidad fueron el glicerol 10 y 20% y el metanol 10% bajo un tiempo de equilibrio de 10 minutos. La mejor velocidad de congelamiento resultó de  $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$  para el glicerol 10%, con 21,83% de supervivencia espermática. En cuanto a la refrigeración, lo recomendado es un período de hasta tres días, obteniendo una supervivencia de 35,26%.

**Palabras-clave:** Langostinos, Criopreservación, Crioprotectores, Glicerol, Metanol.

## ABSTRACT

### **Toxicity tests, freezing methods and cold storage of *Macrobrachium acanthurus* semen.**

The process of cryopreservation of native specie is to safeguard the genetic heritage or induce increased animal production by artificial insemination process, have been used in several water organisms, however unsuccessfully with freshwater shrimp. This study aimed to begin studies with *M. acanthurus* conducting toxicity tests and checking two different methodologies for cryopreservation. In the first part of this study, toxicity tests were performed on the sperm of *Macrobrachium acanthurus* using four cryoprotectants (etilenoglycol, methanol, glycerol and DMSO) for periods of 10 and 20 min at concentrations of 10 and 20%. In the second part, cryopreservation was performed by applying the least toxic cryoprotectant, and two freezing methods were tested over 24 hours: automated (protocols A and B) and conventional (protocols C and D). Protocol A exhibited a cooling rate of  $0.5^{\circ}\text{C min}^{-1}$  from  $-6^{\circ}\text{C}$  until  $-32^{\circ}\text{C}$ ; protocol B was similar to A except for the starting temperature, which was room temperature; and protocols C and D exhibited a cooling rate of 2 and  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , respectively. The third part of the study was conducted to assess the lifespan of the sperm when stored at  $5^{\circ}\text{C}$  during 10 days, and sperm viability was evaluated by a semen smear with eosin-nigrosin. The least toxic cryoprotectants were 10 and 20% glycerol and 10% methanol, and the equilibrium time was 10 minutes. The optimal cooling rate was  $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$  for 10% glycerol, which had a sperm survival rate of 21.83%. Cold storage for up to 3 days is recommended, which presented a sperm survival rate of 35.26%.

**Keywords:** Freshwater prawn, Criopreservation, Crioprotectants, Glycerol, Methanol.

## 1 INTRODUÇÃO

Criopreservação é o processo que envolve os passos da redução da temperatura celular, desidratação, congelamento e descongelamento, permitindo a estocagem do material genético. Esta tecnologia contribui para o melhoramento de espécies animais, propiciar processos de hibridização, conservar a genética de populações, facilitar a translocação de espermatozoides entre fazendas, diminuir o custo com manutenção de reprodutores, diminuir as limitações sazonais da reprodução natural, além da sua importância no processo de domesticação (GWO, 2000; CHAO e LIAO, 2001; MEDEIROS et al., 2002; AKARASANON et al., 2004; CABRITA et al., 2010; BENSON et al., 2012; TSAI e LIN, 2012).

De acordo com Tiersch et al. (2007), na aquicultura, cerca de 200 espécies diferentes já tiveram seus sêmen criopreservados no âmbito da pesquisa, tendendo a se intensificar em virtude da necessidade dos aumentos da produção destes grupos de animais, bem como de se conservar seus recursos genéticos como estratégia para a segurança alimentar, conforme relatado por Paniágua-Chaves et al. (2011). Com estes objetivos, segundo os mesmos autores, a FAO contemplou desde 2007 a criopreservação de germoplasmas (embriões, espermatozoides e ovócitos).

Apesar dos crustáceos decápodos possuírem grande importância econômica, as técnicas para sua criopreservação são ainda limitadas, bem como a aplicação destas a nível industrial, o que tem dificultado sua comercialização (SUBRAMONIAM, 1994; BENSON et al., 2012).

Segundo Anchooguy et al. (1988), Subramonian (1994), Lezcano et al. (2004) e Salazar et al. (2008), um dos principais inconvenientes para a criopreservação de sêmen de camarões é a falta de métodos confiáveis para a determinação da sobrevivência celular após o descongelamento, bem como o tempo de viabilidade deste material criopreservado, quando comparado a outras espécies animais.

Akarasanon et al. (2004), criopreservando sêmen de *Macrobrachium rosenbergii* De Man, 1879 a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 20 dias, utilizando glicerol e etilenoglicol nas concentrações 10 e 20%, observaram redução da sobrevivência espermática a partir do 10º dia de estocagem. Quando criopreservaram em nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) com etilenoglicol 20%, também verificaram redução na sobrevivência ao longo do tempo, encontrando 75% de sobrevivência espermática no 200º dia de estocagem; entretanto, nenhum embrião foi produzido com os espermátóforos criopreservados durante este período. Quedas na sobrevivência também foram reportadas por Nimrat et al. (2006) e Uberti et al. (2014) para *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) e Bambozzi et al. (2014) e Castelo Branco et al. (2014) para *L. schmitti* Burkenroad, 1936.

Independente da técnica, todos os métodos de criopreservação necessitam de crioprotetores, que são compostos químicos que protegem as células contra as distorções provocadas pelo congelamento e descongelamento (FAHY et al., 1990), embora Parks e Graham (1992) mencionem que durante estes processos, as membranas fiquem comprometidas, desestruturando suas ligações lipídicas necessárias ao funcionamento normal.

Segundo Niemann (1991), Denniston et al. (2000) e Beirão et al. (2006), os crioprotetores podem ser classificados em dois grupos: intracelulares (solutos orgânicos responsáveis por proteger as organelas das células durante o resfriamento) e extracelulares (macromoléculas e açúcares cujas funções são reduzir a formação de gelo, facilitar a desidratação das células e proteger a membrana celular).

Benson et al. (2012) mencionaram que um fator importante a ser considerado são as altas concentrações de crioprotetores, que já demonstraram ser citotóxicas e que os testes de

toxicidade específicos para cada tipo celular podem ajudar a otimização dos protocolos de criopreservação, visto que existe uma diferença de permeabilidade de membrana entre e dentre as espécies animais (HOLT, 2000). Gwo (2000) menciona que a escolha do crioprotetor deverá ser de acordo com a espécie de crustáceo e que, o congelamento em nitrogênio líquido varia com o tipo de equipamento utilizado no processo de criopreservação, o tamanho da palheta ou criotubo e a posição da amostra nos tambores criogênicos.

Estudos sobre a criopreservação de sêmen em camarões de água doce estão resumidos a aqueles realizados para *M. rosenbergii* (CHOW, 1982; CHOW et al., 1985; AKARASANON et al., 2004). Assim, o presente trabalho teve como objetivos testar a toxicidade de quatro crioprotetores (DMSO, glicerol, metanol e etilenoglicol) para espermátóforos de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836), bem como avaliar dois sistemas de criopreservação, um convencional e outro automatizado para congelamento de sêmen e verificar a aplicação da refrigeração para manutenção dos espermátóforos “in vivo”, por meio da análise de viabilidade espermática.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Machos de *Macrobrachium acanthurus* foram capturados nos meses de verão (pico reprodutivo) de 2013 e 2014 no rio Sahy (22°56'S; 44°01'W) e conduzidos vivos à Estação de Biologia Marinha da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em Itacuruçá, distrito de Mangaratiba/RJ, sendo aclimatados individualmente, por uma semana, em aquários com capacidade de 24 L (Figura 1), para os testes de toxicidade, criopreservação e resfriamento. Todos os exemplares foram capturados utilizando-se puçás em área de cachoeiras, com correnteza acentuada, sob inúmeras rochas e vegetação marginal.



**Figura 1.** (A) Aquários para aclimação e manutenção dos camarões utilizados no experimento e (B) exemplar macho de *Macrobrachium acanthurus*.

A temperatura foi monitorada diariamente com auxílio de termômetro digital e a amônia e o nitrito a cada dois dias, usando-se kits colorimétricos. O fornecimento de alimento foi diário, sendo constituído por músculo de peixe e lula (alimentação fresca) e ração comercial para reprodutores de camarão marinho (alimentação inerte), na proporção de 2:1, na base de 10% do peso vivo e a renovação da água foi realizada a cada dois dias.

Os camarões foram medidos quanto aos comprimentos total e do cefalotórax, com auxílio de um paquímetro digital (0,01 mm) e pesados em balança analítica (0,1 mg). O espermátóforo foi extraído, utilizando-se o método da eletroestimulação, conforme descrito no Capítulo I, aplicando-se o estímulo de 6,0 volts, sendo posteriormente pesado. Cada camarão foi eletroestimulado apenas uma vez, sendo os espermátóforos utilizados neste experimento, produzidos na natureza.

### 2.1 Teste de Toxicidade

Para este experimento foi utilizado um total de 90 indivíduos machos de *M. acanthurus*, capturados em janeiro de 2013. Inicialmente, foram utilizados 70 camarões, sendo seus espermátóforos distribuídos equitativamente entre os tratamentos, compostos por dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol, glicerol e metanol, nas concentrações de 10 e 20%, com um tempo de equilíbrio de 10 minutos, em um total de 12 repetições por tratamento.

As soluções crioprotetoras foram preparadas utilizando-se água destilada como meio diluidor, conforme descrito por Chow et al. (1985). Os espermátóforos foram distribuídos de forma, que aqueles obtidos de um mesmo camarão não fizessem parte de um mesmo tratamento ou de outro tratamento, que utilizasse crioprotetor semelhante, mesmo que em outra concentração.

Os espermátóforos foram acondicionados em microtubos de plástico de 2,0 mL, sendo um por microtubo, contendo 0,5 mL de solução crioprotetora. Após o tempo de equilíbrio, em temperatura ambiente de 25°C, os espermátóforos foram retirados e lavados em dois enxágues rápidos em água destilada, sendo então transferidos para outro microtubo de plástico de mesma medida, contendo 0,5 mL de água destilada. Em seguida, os espermátóforos foram macerados até o completo rompimento do material e homogeneização com o meio diluidor, formando uma solução espermática. O teste de sobrevivência espermática foi conduzido conforme descrito no Capítulo I, utilizando esfregaço de sêmen corado com eosina-nigrosina.

Os dados foram submetidos ao teste Shapiro-wilk para avaliação da normalidade e Levene para homocedasticidade. Para verificar se houve diferença significativa foi aplicada a análise de variância (ANOVA) e teste t, a 5% de significância. Para aqueles tratamentos em que não foram encontradas diferenças significativas e obtiveram uma boa sobrevivência espermática, os mesmos testes foram realizados adotando-se um tempo de equilíbrio de 20 minutos, seguindo a mesma metodologia descrita acima e utilizando outros 20 camarões capturados no rio Sahy.

Após os testes de toxicidade, os melhores resultados encontrados foram utilizados para a realização do teste de criopreservação.

## 2.2 Testes de Criopreservação e Refrigeração

Foi utilizado um total de 80 machos de *M. acanthurus* para os experimentos realizados em 2014, sendo 45 animais para os testes de criopreservação e 35 para o teste de refrigeração.

Os testes de criopreservação foram realizados aplicando-se dois sistemas de congelamento, sendo o primeiro utilizando um equipamento automatizado (TK Equipamentos para reprodução, modelo TK 3000 compacta SE, Brasil) e o segundo, uma técnica convencional de criopreservação (Figura 2). Para o controle foi realizada contagem a fresco, conforme descrito no Capítulo I.

Os espermátóforos foram acondicionados juntamente com a solução crioprotetora em microtubos de plástico de 2,0 mL, permanecendo em temperatura ambiente por 10 minutos para estabilização (tempo de equilíbrio), enquanto eram envasados em palhetas francesas (IMV<sup>®</sup>) com capacidade de 0,5 mL e lacradas com álcool polivinílico (IMV<sup>®</sup>). Após este período, as palhetas foram conduzidas aos equipamentos de congelamento.

O equipamento utilizado no sistema automatizado consistia de vários protocolos para criopreservação de sêmen e embriões, sendo a temperatura controlada de acordo com aquele selecionado. Dois protocolos de congelamento, A e B (Tabela 1), foram selecionados. O protocolo A foi utilizado por Bambozzi et al. (2014) e Castelo Branco et al. (2014) para *L. schmitti*. Neste protocolo A, a criopreservação foi realizada em duas etapas, onde inicialmente ocorreu a estabilização a -6°C, sendo então introduzidas as palhetas, contendo o espermátóforo e as diferentes soluções crioprotetoras. Após dois minutos realizou-se o “seeding”, sendo em seguida a máquina estabilizada por 10 minutos. Posteriormente, realizou-se a redução da temperatura de -6°C a -32°C, a uma velocidade de resfriamento de 0,5°C min<sup>-1</sup>. As amostras permaneceram por mais cinco minutos no equipamento, antes de serem transferidas para o nitrogênio líquido (-196°C). O protocolo B consistiu dos mesmos procedimentos do protocolo A, entretanto, partindo de uma temperatura ambiente até atingir a temperatura de -6°C.



**Figura 2.** Sistemas automatizado (A) e convencional (B) para criopreservação de espermatóforos de *Macrobrachium acanthurus*. Em destaque, indicado pela seta, o porta palhetas em cada sistema.

Para a criopreservação no sistema convencional (protocolos de congelamento não controlados), adotou-se o procedimento adaptado de Akarasanon et al. (2004). As amostras, após o envase, foram fixadas no suporte em sentido vertical, sendo as palhetas distantes 10 cm da lâmina de nitrogênio líquido. Essas amostras foram submetidas a um pré-congelamento, onde o tempo foi cronometrado a partir de uma temperatura ambiente, até que a temperatura interior atingisse  $-50^{\circ}\text{C}$ . Após a estabilização da temperatura, as palhetas foram submersas no nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em botijão criogênico. Ao final do tempo de pré-congelamento, verificou-se que as velocidades de resfriamento foram em média de  $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$  (protocolo C) e  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$  (protocolo D).

Os tratamentos para o teste de criopreservação foram compostos por quatro protocolos distintos (protocolos A, B, C e D) e as soluções crioprotetoras, aquelas que apresentaram melhor resultado no teste de toxicidade, cada um contendo seis repetições. Para o controle foi utilizado água destilada em temperatura ambiente como meio diluidor, sendo a sobrevivência espermática analisada conforme descrito no Capítulo I.

**Tabela 1.** Protocolos utilizados no sistema automatizado para criopreservação de espermatozóides de *Macrobrachium acanthurus*.

	Protocolo A	Protocolo B
Início	a partir do 1º patamar	a partir da temperatura ambiente
1ª Rampa	-	3°C min <sup>-1</sup>
Temperatura 1º patamar	-6°C	-6°C
“Seeding”	2 min	2 min
Tempo para 2ª rampa	10 min	10 min
2ª Rampa	0,5°C min <sup>-1</sup>	0,5°C min <sup>-1</sup>
Temperatura 2º patamar	-32°C	-32°C
Tempo 2º patamar	5 min	5 min
Transferência para o N <sub>2</sub> L	-196°C	-196°C

As amostras foram descongeladas submergindo as palhetas em água a 30°C, por quatro minutos (CHOW et al., 1985), 24 horas após a criopreservação. Após o descongelamento, as soluções crioprotetoras foram removidas lavando-se o espermatozóide em água destilada. A sobrevivência espermática foi avaliada usando eosina-nigrosina conforme descrito no Capítulo I.

Em relação ao teste de refrigeração, os espermatozóides foram armazenados em microtubos de plástico de 2,0 mL contendo 0,5 mL de água destilada por 10 dias, sem o uso de crioprotetores, sendo o tempo 0 (zero) considerado controle e analisado a fresco. Após um tempo de equilíbrio de 10 minutos em temperatura ambiente, as amostras foram colocadas em geladeira e mantidas a 5°C. Foram utilizadas seis repetições para cada dia, totalizando 66 espermatozóides. A viabilidade espermática também foi analisada mediante esfregaço de sêmen corado com eosina-nigrosina.

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-wilk, Levene para homocedasticidade e posterior análise de variância ( $\alpha=0,05$ ) para testar a significância entre as curvas de criopreservação, bem como o tempo de resfriamento.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Teste de Toxicidade

A temperatura média da água durante o período de aclimação dos espécimes foi de  $23,97 \pm 1,15^{\circ}\text{C}$ , variando de 21,6 a  $25,8^{\circ}\text{C}$ . Os teores de amônia e nitrito da água foram de  $1,10 \pm 0,14$  ppm e  $0,67 \pm 0,30$  ppm, respectivamente e o pH médio foi de  $6,91 \pm 0,36$ , variando de 6,28 a 7,31.

Os camarões apresentaram um comprimento médio do cefalotórax de  $25,55 \pm 3,96$  mm, variando de 18,71 a 32,88 mm e um comprimento total médio de  $83,34 \pm 15,53$  mm, com peso médio de  $12,21 \pm 5,50$  g, variando de 3,79 a 26,19 g. Do total de 90 camarões utilizados no experimento, 85,0% apresentaram espermátóforos (75,5% destes produziram dois espermátóforos), com peso médio de  $1,10 \pm 0,55$  mg.

Observando-se a Tabela 2, os melhores resultados de sobrevivência espermática foram obtidos para o metanol 10%, independente do tempo de equilíbrio ( $p < 0,05$ ); entretanto, quando sua concentração foi aumentada para 20%, este índice diminuiu significativamente em contato com o material seminal por 10 minutos, sendo considerado tóxico e sua utilização, inviável.

No tempo de equilíbrio de 10 minutos, o glicerol 10% e 20% apresentaram resultados semelhantes ( $p < 0,05$ ) ao metanol, não sendo considerados tóxicos aos espermatozoides nestas concentrações. Entretanto, quando o material seminal ficou exposto a estas concentrações por um tempo de 20 minutos, a sobrevivência espermática diminuiu significativamente.

Etilenoglicol e dimetilsulfóxido (DMSO) apresentaram-se tóxicos aos espermatozoides de *M. acanthurus* nas condições testadas neste experimento, conforme apresentado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Sobrevivência espermática média ( $\pm$  erro padrão) em relação ao tempo de equilíbrio, concentração e soluções crioprotetoras utilizadas no teste de toxicidade em *Macrobrachium acanthurus*.

Crioprotetores	10 minutos		20 minutos	
	[10%]	[20%]	[10%]	[20%]
Metanol	$71,85 \pm 2,74^{\text{aA}}$	$49,83 \pm 4,85^{\text{aB}}$	$74,18 \pm 3,50^{\text{aA}}$	-
Glicerol	$65,74 \pm 3,43^{\text{aA}}$	$68,22 \pm 3,37^{\text{aA}}$	$26,76 \pm 8,88^{\text{bB}}$	$23,66 \pm 7,13^{\text{B}}$
Etilenoglicol	$29,46 \pm 6,63^{\text{bB}}$	$23,68 \pm 8,75^{\text{bB}}$	-	-
DMSO	$24,39 \pm 8,28^{\text{Bb}}$	$30,22 \pm 6,64^{\text{bB}}$	-	-

Médias seguidas de letras iguais (minúsculo na coluna e maiúsculo na linha) não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

### 3.2 Testes de Criopreservação e Refrigeração

A temperatura média da água durante o período de aclimação foi de  $26,78 \pm 1,71^{\circ}\text{C}$ , variando de 23,6 a  $30,2^{\circ}\text{C}$ . Os teores de amônia e nitrito foram de  $2,72 \pm 1,51$  ppm e  $0,67 \pm 0,75$  ppm, respectivamente e o pH foi de  $7,32 \pm 0,28$ .

Os camarões apresentaram um comprimento médio do cefalotórax de  $24,38 \pm 3,24$  mm, variando de 17,67 a 32,18 mm e um comprimento total médio de  $72,90 \pm 7,76$  mm, com peso médio de  $9,84 \pm 3,44$  g, variando de 3,39 a 17,69 g. O peso médio dos espermátóforos foi de  $0,64 \pm 0,46$  mg.

A sobrevivência espermática média dos espermatóforos criopreservados por um dia (24 h) estão apresentadas na Tabela 3. Ressalta-se que não houve sobrevivência espermática (0%) entre as amostras congeladas com metanol 10%. Aquelas criopreservadas em glicerol, também foram consideradas tóxicas independente da concentração, sendo significativamente inferiores às amostras analisadas a fresco (controle -  $76,52 \pm 2,06\%$ ).

No sistema automatizado de criopreservação, o protocolo A (glicerol 10% e glicerol 20%) apresentou resultados similares ao protocolo B (glicerol 10% e glicerol 20%), sendo o glicerol 10% do protocolo B, o pior desempenho para sobrevivência espermática ( $p < 0,05$ ).

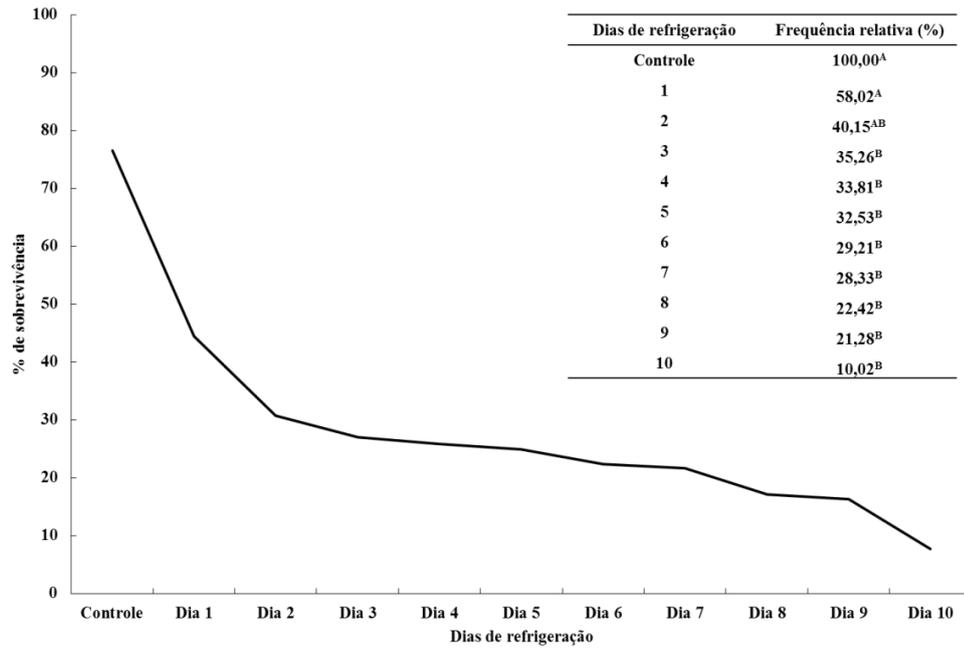
Para o sistema convencional de criopreservação, o glicerol 10% apresentou uma sobrevivência espermática superior ( $p < 0,05$ ) em ambas os protocolos, sendo que no protocolo C ( $21,83 \pm 15,24\%$ ), com um declínio de  $2^\circ\text{C min}^{-1}$  obtendo melhores resultados ( $p < 0,05$ ), que o protocolo D ( $3,40 \pm 3,30\%$ ), com uma rampa de declínio de  $10^\circ\text{C min}^{-1}$ . Entretanto, o glicerol 20% não apresentou o mesmo desempenho (protocolo C -  $0,16 \pm 0,16\%$ ; protocolo D -  $0,08 \pm 0,08\%$ ), sendo a sobrevivência espermática significativamente inferior, quando comparado ao glicerol 10% em ambas as curvas.

No teste de refrigeração, a sobrevivência espermática foi significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) a partir do terceiro dia de estocagem (26,98%), quando comparado ao controle (76,52%) (Figura 3). Entretanto, após o primeiro dia de refrigeração, a sobrevivência espermática decaiu 41,98%, apesar de não ter sido considerada significativa ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 3.** Sobrevivência espermática (%) para espermatóforos de *Macrobrachium acanthurus* criopreservados durante 24 h em glicerol 10 e 20% em diferentes velocidades de resfriamento e protocolos de congelamento.

Protocolos de congelamento	Velocidade de resfriamento	Crioprotetores/Concentrações	Sobrevivência espermática (%)
<b>Controle</b>	Temperatura ambiente	Água destilada	$76,52 \pm 2,06^A$
<b>A</b>	$0,5^\circ\text{C min}^{-1}$	Glicerol 10%	$11,21 \pm 8,96^B$
	$0,5^\circ\text{C min}^{-1}$	Glicerol 20%	$9,74 \pm 5,51^B$
<b>B</b>	$0,5^\circ\text{C min}^{-1}$	Glicerol 10%	$4,01 \pm 3,13^C$
	$0,5^\circ\text{C min}^{-1}$	Glicerol 20%	$11,10 \pm 11,10^B$
<b>C</b>	$2^\circ\text{C min}^{-1}$	Glicerol 10%	$21,83 \pm 15,24^B$
	$2^\circ\text{C min}^{-1}$	Glicerol 20%	$0,16 \pm 0,16^D$
<b>D</b>	$10^\circ\text{C min}^{-1}$	Glicerol 10%	$3,40 \pm 3,30^C$
	$10^\circ\text{C min}^{-1}$	Glicerol 20%	$0,08 \pm 0,08^E$

Valores com letras iguais não denotam diferença significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparados os protocolos A x B (sistema automatizado) e C x D (sistema convencional) ao controle.



**Figura 3.** Porcentagem média e frequência relativa da sobrevivência espermática para espermátóforos de *Macrobrachium acanthurus*, ao longo de 10 dias de refrigeração à 5°C sem uso de crioprotetor.

## 4 DISCUSSÃO

Os crioprotetores visam minimizar os processos deletérios, que ocorrem na célula espermática durante o congelamento e descongelamento, entretanto poucos estudos que comprovem suas concentrações adequadas na criopreservação do sêmen de camarões de água doce foram realizados, provavelmente em virtude destas substâncias serem espécie-específicas (GWO, 2000) e limitando as pesquisas ao *M. rosenbergii* por ser a espécie de maior importância no mercado mundial.

Segundo Kasai (1996), agentes com rápida capacidade de penetração são mais favoráveis, porque o tempo de exposição ao crioprotetor antes do rápido resfriamento é curto, prevenindo assim as injúrias osmóticas. Os crioprotetores intracelulares atuam por meio de suas propriedades coligativas, e diminuem o ponto crioscópico intracelular, de maneira que uma quantidade maior de água permanecerá no estado líquido sob baixas temperaturas, diminuindo a concentração intracelular dos solutos, propiciando um ambiente menos deletério à célula espermática durante o congelamento (WATSON, 1995). Segundo Spindler et al. (2012), a viabilidade celular é maior na presença de um crioprotetor intracelular, sendo esta dependente do tipo e concentração deste, bem como da temperatura de descongelamento.

Harvey e Ashwood-Smith (1982) e Harvey e Carolsfeld (1993), mencionam que o metanol é a substância que mais facilmente permeia a membrana celular, em virtude de seu baixo peso molecular, entretanto é considerada a mais tóxica. Neste experimento, a toxicidade desta substância somente pode ser notada durante o processo de criopreservação, quando foi encontrado 100% de mortalidade ao final de 24 horas, corroborando com os estudos de Rapatz (1973) em sapos. Este mesmo autor mencionou que o metanol é tóxico em temperaturas próximas ao ponto de congelamento, pois sua concentração no interior da célula, aumenta a medida que a água se congela (MERYMAN et al., 1977). Resultados semelhantes ao do presente estudo também foram reportados por Bhavanishankar e Subramoniam (1997) para o siri *Scylla serrata* (Forskål, 1775). No entanto, metanol 10% foi o que apresentou resultados mais satisfatórios na criopreservação de embriões, náuplios, zoeas e espermatozoides de peneídeos (NEWTON e SUBRAMONIAN, 1996; GWO e LIN, 1998; LEZCANO et al., 2004).

De acordo com Parks e Graham (1992) e Angola (1994), o glicerol penetra e confere proteção à membrana celular, reduzindo o número de poros e suas funções ATP-dependentes, promovendo assim a agregação protéica e a formação de blocos de lipídios. Segundo Jeyalectumie e Subramoniam (1989) e Bhavanishankar e Subramoniam (1997), o sucesso desta substância na criopreservação, se deve ao fato de ser um produto intermediário natural no metabolismo dos lipídios. Apesar de seus efeitos essenciais no processo de criopreservação celular, o glicerol pode também produzir efeitos deletérios aos espermatozoides, por apresentar graus de toxicidade dependentes de sua concentração utilizada, que deve estar entre a mínima necessária para promover a proteção e a máxima permitida para não causar danos aos espermatozoides (PARKS e GRAHAM, 1992; ANGOLA, 1994; COTORELLO e HENRY, 2002).

No presente trabalho, o glicerol não apresentou ser tóxico nas concentrações testadas, apenas quando os espermatóforos ficaram expostos por um período superior a 10 minutos. O mesmo foi reportado por Chow et al. (1985) em *M. rosenbergii*, quando testou sete tempos de exposição ao glicerol 10%. Este efeito tóxico poderia estar relacionado a uma alteração na fluidez da membrana celular, provocada por uma intercalação na dupla camada lipídica, o que modificaria a viscosidade citoplasmática e, dessa maneira, afetaria todas as reações metabólicas (HAMMERSTEDT e GRAHAM, 1992; McLAUGHLIN et al., 1992). Fahy

(2010) mencionou que células expostas por um longo tempo ao crioprotetor começam a degradar, gerando metabólitos tóxicos, limitando a utilização destes.

Utilizando um tempo de 10 minutos de equilíbrio, Castelo Branco et al. (2014) não reportaram toxicidade para o uso de glicerol 5 e 10% na criopreservação de espermatozoides de *L. schimitti*, com viabilidade de 79,8%, sendo superiores aos resultados do presente estudo.

De acordo com Anchoroguy et al. (1987) e De Leeuw et al. (1993), a interação entre as moléculas do glicerol e das bicamadas fosfolipídicas são mais fracas, que aquelas com sacarose e trealose, crioprotetores extracelulares. Segundo os mesmos autores, a interação entre os dissacarídeos são mais efetivos em estabilizar a bicamada lipídica, que os monossacarídeos, uma vez que se ligam por pontes de hidrogênio, causando uma expansão destas camadas, diminuindo a temperatura de transição da fase de gel, minimizando a fusão das bicamadas lipídicas adjacentes e estabilizando o processo a partir de baixas concentrações. Estas ligações promovidas pelas pontes de hidrogênio são tão fortes, que permanecem ao longo de todo o processo de congelamento.

Desta forma, uma interação entre estes crioprotetores, poderia tornar a proteção à membrana celular mais estável, se mantendo durante todo o processo de congelamento, bem como a redução da concentração do crioprotetor intracelular, diminuindo assim, a toxicidade provocada por este, otimizando sua ação (DENNISTON et al., 2000; GREEN, 2005; DIGMAYER, 2010). Segundo Storey e Storey (1996), o congelamento de células na ausência de um crioprotetor pode levá-las a sofrer um choque osmótico ou um colapso em seu volume, ao qual pode ser resultado de um permanente estado de gel da bicamada lipídica.

De acordo com Akarasanon et al. (2004), o etilenoglicol possui menor peso molecular e toxicidade que o glicerol e alta permeabilidade celular. Este crioprotetor possui capacidade de preservar o acrossomo, podendo significar uma melhor preservação de outras estruturas dos espermatozoides, como o núcleo, fundamental para que ocorra um perfeito desenvolvimento embrionário; segundo o mesmo autor, esta proteção pode ser explicada pela sua velocidade de penetração na célula, diminuindo a alta concentração de sais no interior do espermatozoide, que é nocivo à membrana espermática (HOLT et al., 1992; MORAES et al., 1998).

Apesar destas características consideradas favoráveis, o etilenoglicol não apresentou bons resultados em *M. acanthurus*, no presente estudo, quando comparado ao glicerol e metanol, o que poderia ser explicado pela concentração utilizada ou pelo tempo de equilíbrio adotado. Akarasanon et al. (2004) utilizando etilenoglicol e glicerol nas concentrações de 10 e 20%, num tempo de equilíbrio de 60 minutos, encontraram resultados similares de toxicidade para *M. rosenbergii*, discordando do presente trabalho. Entretanto, estes mesmos autores revelaram uma queda na qualidade espermática, quando os espermatóforos foram criopreservados com etilenoglicol 20% a -196°C por um longo período de tempo. Uberti et al. (2014) utilizaram etilenoglicol e dimetilsulfóxido (DMSO) 10%, com um tempo de equilíbrio de 10 minutos para a criopreservação de sêmen de *L. vannamei*, não reportando diferença significativa para sobrevivência espermática entre os crioprotetores.

O dimetilsulfóxido (DMSO) é um crioprotetor amplamente utilizado para criopreservação e que possui alta permeabilidade celular. Entretanto, somente esta permeabilidade não consegue explicar seu efeito crioprotetor, pois apesar de preservar a integridade de proteínas isoladas e os fosfolipídios das membranas, em elevadas concentrações são conhecidos por serem tóxicos (ANCHOROGUY et al., 1991), sendo sua toxicidade à temperatura ambiente mencionada por Jeyalectumie e Subramoniam (1989). Os resultados negativos aqui reportados para este crioprotetor podem ser justificados pelo teste de toxicidade ter sido realizado à temperatura ambiente, causando possíveis lesões aos espermatozoides em virtude do tempo de exposição dos espermatóforos ao mesmo (10 minutos) ou a concentração aplicada (10%). Vuthiphandchai et al. (2007) encontraram menos

de 20% de sobrevivência espermática quando fez uso de DMSO 15% em espermatóforos de *P. monodon* e completa mortalidade quando exposto a 20%. Esses mesmos autores reportaram que quanto maior o tempo de equilíbrio, maior a mortalidade espermática encontrada. Desta forma, provavelmente o uso de menores concentrações associadas a um menor tempo de equilíbrio, poderia viabilizar o uso deste crioprotetor.

Entretanto, DMSO foi utilizado com sucesso na criopreservação de semen de *S. serrata* (JEYALECTUMIE e SUBRAMONIAM, 1989), camarões marinhos (ANCHORDOGUY et al., 1988; DIWAN e JOSEPH, 1999; VUTHIPHANDCHAI et al., 2007) e lagostas (SASIKALA e MEENA, 2009), em concentrações inferiores a do presente estudo ou associados a crioprotetores extracelulares, corroborando com os estudos de Fahy (1986). Em *Limulus polyphemus* (Lineu, 1758), Behlmer e Brown (1984) não obtiveram sobrevivência espermática utilizando o DMSO como crioprotetor.

O sistema automatizado para criopreservação de sêmen vem sendo praticado para diversas espécies animais, incluindo vertebrados (LEITE et al., 2010; ABUD et al., 2014) e invertebrados (BHAVANISHANCAR e SUBRAMONIAM, 1997; VUTHIPHANDCHAI et al., 2007; BAMBOZZI et al., 2014; CASTELO BRANCO et al., 2014).

No presente estudo, a velocidade de resfriamento pode ter sido o fator preponderante para a queda de sobrevivência entre os métodos convencionais de criopreservação, visto que o protocolo C foi significativamente melhor que o protocolo D. A esta menor sobrevivência, pode-se atribuir às crioinjúrias causadas pela formação de cristais de gelo intracelular, não havendo a adequada desidratação celular durante o período de rápido congelamento, tornando a membrana celular mais sensível às mudanças osmóticas. Segundo Mazur (1984) e Angola (1994), se o ritmo de congelamento for rápido (redução da temperatura maior que 10-20°C/min) a água intracelular não tem tempo de sair, formando microcristais de gelo. Estes microcristais são instáveis e durante o descongelamento agrupam-se formando grandes cristais, sendo letais às células.

Quando comparadas as velocidades de resfriamento do sistema convencional com a do sistema automatizado (0,5°C min<sup>-1</sup>), verificou-se que esta última pode ter sido muito lenta, fazendo com que a solução crioprotetora permanecesse em contato com o material seminal por um tempo maior, antes do total congelamento, tornando-se assim letal aos espermatozoides. Por outro lado, de acordo com Santos (2000), se o congelamento for lento, a injúria se deve principalmente à desidratação excessiva ou à grande formação de gelo no exterior das células. Nestes casos poderá ocorrer rompimento das membranas, concentração de solutos no citoplasma a níveis tóxicos e desnaturação de ácidos nucleicos e membranas. Desta forma, o congelamento de uma célula deverá ser tão rápido quanto possível, para evitar os efeitos dos crioprotetores, mas eficientemente lento para que as células possam desidratar (MAZUR et al., 1972; MEDEIROS et al., 2002).

Bambozzi et al. (2014) fazendo uso de temperaturas iguais de resfriamento (0,5°C min<sup>-1</sup>) e criopreservando em glicerol 10%, obtiveram melhores resultados para *L. schmitti*, quando comparados aos do presente estudo. Anchoroguy et al. (1988) reportaram que, para *Sicyonia ingentins* (Burkenroad, 1938), utilizando uma taxa de resfriamento de 1°C min<sup>-1</sup>, obtiveram 88% de espermatozoides intactos pós-congelamento, ao passo que em temperaturas acima de 5°C min<sup>-1</sup> houve lise celular. A 10°C min<sup>-1</sup>, a sobrevivência espermática encontrada por estes autores foram similares as do presente estudo, bem como a reportada por Lezcano et al. (2004) em *L. vannamei*, quando todas as células foram destruídas. Chow et al. (1985) também relataram a influência negativa do resfriamento rápido sobre a viabilidade espermática em *M. rosenbergii*.

Abud et al. (2014) mencionaram que, apesar do sistema convencional de criopreservação possuir um baixo custo quando comparado ao automatizado, o sêmen criopreservado poderá ter uma baixa qualidade em virtude das variações de temperatura

durante o processo de congelamento, além da qualidade e dimensões da caixa de isopor e nível de nitrogênio. Entretanto, como o experimento foi executado dentro de laboratório, sem variações extremas de temperatura, a curva pode não ter sofrido grandes variações, o que pode ter inferido de forma positiva no resultado.

Outro fator de grande importância é o protocolo de descongelamento do sêmen. No presente estudo (30°C por 4 min.) foi similar, a aqueles reportados por Akarasanon et al. (2004) para *M. rosenbergii* (30°C por 5 min.) e por Vuthiphandchai et al. (2007) para *P. monodon* (30°C por 2 min.), apesar de não corroborar com os resultados positivos destes autores. Uberti et al. (2014) e Castelo Branco et al. (2014) utilizando a temperatura de 20-25°C por 40 segundos e 20°C por 10 segundos reportaram sobrevivência espermática no descongelamento de massas espermáticas em *L. vannamei* e *L. schmitti*, respectivamente. Bhavanishankar e Subramoniam (1997) descongelaram sêmen de *S. serrata* a 55°C por 10-15 segundos, obtendo resultados positivos, quanto à sobrevivência espermática. Segundo Gwo (2000), quanto mais rápido for o descongelamento do sêmen em invertebrados aquáticos, melhor será o resultado da fertilidade.

Estudos comparando a influência da temperatura e o tempo desta, sobre a qualidade espermática mostraram que a temperatura mais elevada associada ao menor tempo, promove adequada qualidade pós-descongelamento (PEÑA e LINDE-FORSBERG, 2000; MADEIRA et al., 2010). Segundo Sodesquist et al. (1997), o descongelamento rápido reduz a formação de cristais de gelo intracelular e permite a diminuição do estresse da célula espermática; por outro lado, o descongelamento lento expõe a célula espermática a maiores oscilações de temperatura, proporcionando um aumento na deposição lipídica e proteica, influenciando diretamente na estrutura física da célula, diminuindo assim, a viabilidade espermática (PEÑA e LINDE-FORSBERG, 2000).

Em relação à refrigeração, Chow (1982) refrigerando espermátóforo de *M. rosenbergii* mencionou que temperaturas entre 2 e 7°C parece não exigir a presença de crioprotetores, sendo bem sucedido por até 4 dias. O mesmo foi relatado por Ishida et al. (1986) em lagostas do gênero *Homarus*. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados no presente estudo, em que a sobrevivência espermática só se apresentou significativamente inferior, a partir do terceiro dia.

## 5 CONCLUSÃO

Conclui-se, portanto, que para o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação de espermatóforos para *M. acanthurus*, há a necessidade de se estabelecer o melhor crioprotetor, sua concentração e o tempo máximo e mínimo de exposição a este, bem como as velocidades de congelamento e descongelamento. No presente estudo, apesar de tóxico, o glicerol 10% demonstrou ser o melhor crioprotetor, num tempo de equilíbrio de 10 min. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para verificar sua toxicidade em concentrações inferiores e suas possíveis associações com crioprotetores extracelulares, tal como os tempos de equilíbrio.

Em relação à metodologia de congelamento, embora o sistema automatizado seja considerado mais confiável, o sistema convencional, em virtude principalmente de seu baixo custo, pode ser utilizado como uma alternativa no processo de criopreservação, desde que o operador esteja capacitado a realizar o congelamento.

No presente estudo, a melhor velocidade de congelamento foi a de  $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , havendo necessidade de outros estudos em relação à temperatura e ao tempo de descongelamento a ser adotado, pois estes refletem na viabilidade espermática final.

Apesar dos esforços em criopreservar espermatóforos de camarões de água doce, no presente estudo, a refrigeração por um período de até 3 dias a  $5^{\circ}\text{C}$  se mostrou mais promissora.

## CONCLUSÕES GERAIS

- Para *M. acanthurus*, a voltagem considerada ideal para a extração do espermatóforo foi 6,0 Volts, em virtude da baixa mortalidade final de camarões;
- Para extração de espermatóforos, os machos devem possuir pelo menos 18,00 mm de comprimento de cefalotórax e 5,00 g de peso vivo;
- Peso e tamanho dos reprodutores não interferem no peso dos espermatóforos produzidos;
- Para as condições aqui testadas, uma dieta à base de alimentos fresco e seco (2:1) mantiveram a sobrevivência espermática, o peso do espermatóforo e o crescimento do animal ao longo do período experimental, sendo, portanto considerada aquela ideal para aplicações em estudos de criopreservação;
- Machos de *M. acanthurus* demonstraram produzir espermatozoides com maior sobrevivência mesmo com dietas contendo baixos teores de proteína bruta (100% alimento fresco - 14%PB), podendo ser utilizados com eficiência em programas de inseminação artificial ou reprodução natural;
- A melhor velocidade de congelamento foi de 2°C min<sup>-1</sup> (21,83% de sobrevivência espermática), havendo necessidade de outros estudos em relação à temperatura e ao tempo de descongelamento a ser adotado, pois estes refletem na viabilidade espermática final;
- Para as condições testadas, o glicerol parece ser o melhor crioprotetor intracelular para sêmen de *M. acanthurus*, sendo necessário testes incluindo crioprotetores extracelulares;
- Sêmen refrigerado por até 3 dias a 5°C pode ser utilizado em programas de inseminação artificial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUD, C.O.G.; ABUD, L.J.; OLIVEIRA NETO, J.C.; DODE, M.A.N.; SERENO, J.R.B.; MARTINS, C.F. Comparação entre os sistemas automatizado e convencional de criopreservação de sêmen bovino. **Ciência Animal Brasileira**, v.15, p. 32-37, 2014.
- ADAMS, S.L.; HESSIAN, P.A.; MLADENOV, P.V. The potential for cryopreserving larvae of the sea urchin, *Evechinus chloroticus*. **Cryobiology**, v.52, p.139-145, 2006.
- ADAMS, S.L.; TERVIT, H.R.; MCGOWAN, L.T.; SMITH, J.F.; ROBERTS, R.D.; SALINAS-FLORES, L.; GALE, S.L.; WEBB, S.C.; MULLEN, S.F.; CRITSER, J.K. Towards cryopreservation of Greenshell mussel (*Perna canaliculus*) oocytes. **Cryobiology**, v.58, p.69-74, 2009.
- ADIYODI, R.G. Reproduction and its control. In: BLISS, D.E.; MANTEL, L.H. (Eds.) **The Biology of Crustacea**. Academic Press, UK, vol. 9, 1985. p. 147-215.
- AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S.A.; SAID, T.M. Prevention of oxidative stress injury to sperm. **Journal of Andrology**, v.26, p.654-660, 2005.
- AKARASANON, K.; DAMRONGPHOL, P.; POOLSANGUAN, W. Long-term cryopreservation of spermatophore of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). **Aquaculture Research**, v.35, p.1415-1420, 2004.
- ALBERTONI, E.F.; PALMA-SILVA, C.; ESTEVES, F.A. Fecundity of *Macrobrachium acanthurus* Wiegmann, 1836 (Decapoda, Palaemonidae) in a tropical coastal lagoon subjected to human impacts (Macaé, Brazil). **Acta Limnologica Brasileira**. v.14, p. 71-80, 2002a.
- ALBERTONI, E.F.; PALMA-SILVA, C.; ESTEVES, F.A. Distribution and growth in adults of *Macrobrachium acanthurus* Wiegmann, (Decapoda, Palaemonidae) in a tropical coastal lagoon, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.19, p. 61-70, 2002b.
- ALBERTONI, E.F.; PALMA-SILVA, C.; ESTEVES, F.A. Natural diet of three species of shrimp in a Tropical Coastal Lagoon. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.46, p. 395-403, 2003.
- ALFARO-MONTOYA, J. Reproductive quality evaluation of male *Penaeus stylirostris* from a grow-out pond. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.24, p. 6-11, 1993.
- ALFARO-MONTOYA, J. The reproductive conditions of male shrimps, genus *Penaeus*, sub-genus *Litopenaeus* (open thelyca penaeoid shrimps): a review. **Aquaculture**, v.300, p. 1-9, 2010.
- ALFARO, J.; LOZANO, X. Development and deterioration of spermatophores in pond-reared *Penaeus vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.24, p. 522-529, 1993.

ALVES, P.C.; RAMOS, M.P.; SUAREZ, M.A. **Cultivo de camarões do gênero *Macrobrachium* Bate (Decapoda, Palaemonidae) do Brasil**. Boletim Técnico 86, 66p. 1981.

ANCHORDOGUY, T.J.; CROWE, J.H.; GRIFFIN, F.J.; CLARK Jr, W.H. Cryopreservation of sperm from the marine shrimp *Sicyonia ingentis*. **Cryobiology**, v.25, p. 238-243, 1988.

ANCHORDOGUY, T.J.; CECCHINI, C.A.; CROWE, J.H.; CROWE, L.M. Insights into the cryoprotective mechanism of Dimethyl Sulfoxide for phospholipid bilayers. **Cryobiology**, v.28, p.467-473, 1991.

ANCHORDOGUY, T.J.; RUDOLPH, A.S.; CARPENTER, J.F.; CROWE, J.H. Models of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. **Cryobiology**, v.24, p.324-331, 1987.

ANDRIGUETTO, J.M.; HAIMOVICI, M. Reproductive cycle of *Loligo sanpaulensis* Brakoniecki, 1984 (Cephalopoda:Lologinidae) in southern Brazil. **Scientia Marina**, v.60, p. 443-450, 1996.

ANGER, K.; MOREIRA, G.S. Morphometric and reproductive traits of tropical caridean shrimps. **Journal of Crustacean Biology**, v.18, p. 823-838, 1998.

ANGOLA, A.P. Aspectos fisiológicos acerca del congelamiento de semen. **Revista Veterinária México**, v.25, n.3, p. 207-201, 1994.

ANTUNES, L.S.; OSHIRO, L.M.Y. Aspectos reprodutivos do camarão de água doce *Macrobrachium potiuna* (Müller) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) na Serra do Piloto, Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.21, p. 261-266, 2004.

ANZUATEGUI, I.A.; VALVERDE, C.C. **Rações pré-calculadas para organismos aquáticos: peixes tropicais, trutas, rãs e camarão de água doce**. Guaíba: Agropecuária. 1998, 135p.

AOAC. **Official methods of analysis**. 17. ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, 2000.

ARCOS-ORTEGA, G.F. **Análisis fisiológico y genético del desempeño reproductivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei***. 2004. 244p. Tese (Doutorado em Ciências). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz/B.C.S./México, 2004.

BALLOU, J.D. Potential contribution of cryopreserved germ plasm to the preservation of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity. **Cryobiology**, v.29, p. 19-25, 1992.

BAMBOZZI, A. **Morfologia e criopreservação do espermatozoide do camarão branco *Litopenaeus schimitti* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae)**. 2013. 69 p. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica/RJ/Brasil, 2013.

BAMBOZZI, A.; MATTOS, L.A.; MELLO, M.R.B.; OSHIRO, L.M.Y. Criopreservação do espermatóforo e da massa espermática do camarão branco *Litopenaeus schmitti* post-mortem. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.40, p. 49-60, 2014.

BARBAS, J.P.; MASCARENHAS, R.D. Cryopreservation of domestic animal sperm cell. **Cell & Tissue**, v.10, p.49-62, 2009.

BARTLETT, P.; ENKERLIN, E. Growth of the prawn *Macrobrachium rosenbergii* in asbestos asphalt ponds in hard water and on a low protein diet. **Aquaculture**, v.30, p. 353-356, 1983.

BASKAR, N.V.; MARIAPPAN, S.; SURENDRARAJ, A.; VENKATARAMANI, V.K. Broodstock development in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* by artificial insemination. **Indian Journal of Fisheries**, v.51, p. 517-520, 2004.

BAUDOT, A.; CAULA, C.; DUARTE, M.L.; FAUSTO, R. Thermal study of simple aminoalcohol solution. **Cryobiology**, v.44, p.150-160, 2002.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.F.; MEYERS, S.A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.24, p.621-628, 2003.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y.J.K.; LIMA, D.P. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Química Nova**, v.34, p.306-319, 2011.

BECOMI, M.T.; FRANCIÀ, C.R.; MORA, N.G.; AFFRANCHINO, M.A. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology**, v.40, p.841-851, 1993.

BEHLMER, S.; BROWN, G. Viability of cryopreserved spermatozoa of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus* L. **International Journal of Invertebrate Reproduction and Development**, v. 7, p. 193-199, 1984.

BEIRÃO, J.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, M.P.; SARASQUETE, C.; DINIS, M.T.; CABRITA, E. Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. **Aquaculture**, v.261, p.897-903, 2006.

BELLAS, J.; PAREDES, E. Advances in the cryopreservation of sea-urchin embryos: potential application in marine water quality assessment. **Cryobiology**, v.62, p.174-180, 2011.

BENSON, J.D.; WOODS, E.J.; WALTERS, E.M.; CRITSER, J.K. The cryobiology of spermatozoa. **Theriogenology**, v.78, p.1682-1699, 2012.

BERNARDI, N. Temperature influence upon food ingestion and spontaneous locomotion of the freshwater prawn *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). **Journal of Thermal Biology**, v.15, p. 33-36, 1990.

BHAVANISHANKAR, S.; SUBRAMONIAM, T. Cryopreservation of spermatozoa of the edible mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) **Journal of Experimental Zoology**, v. 277, p. 326-336, 1997.

BONACINA, M.; QUEIROZ, M. Elaboração de empanado a partir de corvina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p. 544-552, 2007.

BRAGA, A.L., NAKAYAMA C.L., POERSCH, L.H. & WASIELESKY Jr. W. Unistellate spermatozoa of decapods: comparative evaluation and evolution of the morphology. **Zoomorphology**, v.132, 261-284, 2013a.

BRAGA, A.L.; LOPES, D.L.A.; POERSCH, L.H.; WASIELESKY Jr., W. Spermatophore and sperm quality of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* fed with fresh food supplemented with pollen and paprika. **Aquaculture**, v.380-383, p. 29-32, 2013b.

BRAGA, A.L.; NAKAYAMA, C.L.; MARTINS, J.G.; COLARES, E.P.; WASIELESKY JR., W. Spermatophore quality of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda, Dendrobranchiata) broodstock fed with different maturation diets. **Aquaculture**, v.307, p. 44-48, 2010.

BRAILOVSKY, G.S.P.; GALERA, E.S. Comportamento osmorregulador de *Macrobrachium tenellum* y *Macrobrachium acanthurus* (Decapoda, Palaemonidae) en diferentes salinidades. **Revista de Biología Tropical**, v.45, p. 1085-1091, 1997.

BRAKONIECKI, T.F. A full description of *Loligo sanpaulensis* Brakonieccki, 1984, and a redescription of *Loligo gahi* D'Orbigny, 1835, two species of squid (Cephalopoda:Myopsida) from the Southwest Atlantic. **Bulletin of Marine Science**, v.34, p. 435-448, 1984.

BRAY, W.A.; LEUNG-TRUJILLO, J.R.; LAWRENCE, A.L.; ROBERTSON, S.M. Preliminary investigation of the effects of the temperature. Bacterial inoculation and EDTA on sperm quality in captive *Penaeus setiferus*. **Journal of the World Mariculture Society** v.16, p. 250-257, 1985.

BRAY, W.A.; LAWRENCE, A.L. Reproduction of *Penaeus* species in captivity. In: FAST, A.W.; LESTER, L.J. (Eds.) **Marine Shrimp Culture: principles and practices**. Elsevier, New York, 1992. p. 93-171.

BRAYTON, C.F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. **Cornell Veterinary**, v.76, p.61-90, 1986.

BROUWERS, J.F.H.M.; GADELLA, B.M. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free radical biology & Medicine**, v.35, p.1382-1391, 2003.

BROWDY, C.L. A review of reproductive biology of *Penaeus* species: Perspectives on controlled shrimp maturation systems for high quality nauplii production. In: WYBAN J. (Ed.) **Proceedings of the special session on shrimp farming**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA Estados Unidos, 1992. p. 22-51.

BROWDY, C.L. Recent developments in penaeid broodstock and seed production technologies: improving the outlook for superior captive stocks. **Aquaculture**, v.164, p. 3-21, 1998.

BUGNOT, A.B.; LÓPEZ GRECO, L.S. Sperm production in the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). **Aquaculture**, v. 295, p. 292-299, 2009.

CABRITA, E., SARASQUETE, C., MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., ROBLES, V., BEIRÃO, J., PÉREZ-CEREZALES, S.; HERRAEZ, M.P. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **Journal of Applied Ichthyology**, v.26, p.623-635, 2010.

CAMACHO, M.E.; ÁLVAREZ, F.; VILLALOBOS, J.L. Palaemonidae (camarones de río, langostinos). In: SORIANO, E.G.; DIRZO, R.; EVOGT, R.C. (Eds.). **Historia Natural de Los Tuxtlas**. Instituto de Biología-UNAM, Instituto de Ecología-UNAM, CONABIO, México, 1997. p. 411-414.

CARVALHO, H.A. Morfologia do aparelho reprodutor de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1863) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). Parte I – Masculino. **Ciência e Cultura**, v.32, p. 73-79, 1980.

CASTELO BRANCO, T. **Avaliação de técnicas de criopreservação de sêmen do camarão branco, *Litopenaeus schmitti* (Crustacea, Dendrobranchiata, Penaeidae)**. 2010. 28p. Dissertação (Mestre em Ciências). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica/RJ/Brasil, 2010.

CASTELO BRANCO, T.; BAMBOZZI, A.; MELLO, M.R.B.; OSHIRO, L.M.Y. Cryopreservation and sperm storage of the white shrimp. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.40, p. 17-22, 2014.

CAVALCANTE, D.V. **Biologia e ecologia do camarão dulcícola *Macrobrachium surinamicum* Holthuis, 1948 (Decapoda: Palaemonidae) no estuário guajará, Pará, costa norte do Brasil**. 2012. 102 p. Dissertação (Mestre em Ecologia Aquática e Pesca). Universidade Federal do Pará, Belém/Brasil, 2012.

CAVALLI, R.O., PEIXOTO, S.M., WASIELESKY Jr., W. Performance of *Penaeus paulensis* (Pérez-Farfante) broodstock under long-term exposure to ammonia. **Aquaculture Research**, v.29, p. 815-822, 1998.

CAVALLI, R.O., LAVENS, P., SORGELOOS, P. Performance of *Macrobrachium rosenbergii* broodstock fed diets with different fatty acid composition. **Aquaculture**, v.179, p. 387-402, 1999.

CEBALLOS-VÁZQUEZ, B.P.; ROSAS, C.; RACOTTA, I.S. Sperm quality in relation to age and weight of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 228, p. 141-151, 2003.

CEBALLOS-VÁZQUES, B.P.; PALACIOS, E.; AGUILAR-VILLAVICENCIO, J.; RACOTTA, I.S. Gonadal development in male and female domesticated whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in relation to age and weight. **Aquaculture**, v. 308, p. 116-123, 2010.

CHANMUNGAM, P.; DONOVAN, J.; WHEELER, C.J.; HWANG, D.H. Differences in the lipid composition of fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii* and marine shrimp. **Journal of Food Science**, v.48, 1440-1443, 1983.

CHAO, N.H.; LIAO, I.C. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. **Aquaculture**, v.197, p.161-189, 2001.

CHAKRABARTY, J.; BANERJEE, D.; PAL, D.; DE, J.; GHOSH, A.; MAJUNDER, G.C. Shedding off specific lipids constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. **Cryobiology**, v.54, p.27-35, 2007.

CHOUDHURY, P.C. Complete larval development of the palaemonid shrimp *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836), reared in the laboratory. **Crustaceana**, v.18, p. 113-132, 1969.

CHOW, S. Artificial insemination using preserved spermatophores in the palaemonid shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v.48, p.1693-1695, 1982.

CHOW, S.; OGASAWARA, Y.; TAKI, Y. Male reproductive system and fertilization of the palaemonid shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v.48, p. 177-183, 1982.

CHOW, S.; TAKI, Y.; OGASAWARA, Y. Cryopreservation of spermatophore of the fresh water shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*. **Biological Bulletin**, v.168, p.471-475, 1985.

CHOWDHURY, M.A.K.; GODA, A.M.A.S.; EL-HAROON, E.R.; WAFI, M.A.; EL-DIN, S.A.S. Effect of dietary protein and feeding time on growth performance and feed utilization of post larval freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). **Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v.3, p. 1-11, 2008.

COELHO, P.A.; RAMOS-PORTO, M. Malacostraca – Eucarida – Caridae (Alpheoidea Excluded). In: YOUNG, P.S. (Ed.) **Catalogue of Crustacea of Brazil**. Museu Nacional, 1998. p. 325-350.

COELHO, P.A., PORTO, M.R.; SOARES, C.M.A. **Biologia e cultivo de camarões de água doce**. Série Aquicultura, v. 1, Recife, PE: UFPE. 58 p, 1982.

COLLART, O.O. Aspectos ecológicos do camarão *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) no baixo Tocantins (PA-Brasil). **Memorias de la Sociedad de Ciencias Naturales La Salle**, v. 48, p. 341-353, 1988.

COMAN, G.J., ARNOLD, S.J., CALLAGHAN, T.R., PRESTON, N.P. Effect of two maturation diet combinations on reproductive performance of domesticated *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v.263, p. 75-83, 2007.

COTORELLO, A.C.P.; HENRY, M. Princípios da criopreservação, congelamento e avaliação do sêmen equino (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p. 14-25, 2002.

- CREXI, V.T.; GRUNENVALDT, F.L.; SOARES, L.A.S.; PINTO, L.A.A. Deodorisation process variables for croaker (*M. furnieri*) oil. **Food Chemistry**, v. 114, p. 396-401, 2009.
- CURRY, M.R.; WATSON, P.F. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. **Cryobiology**, v.31, p.39-46, 1994.
- D'ABRAMO, L.R.; SHEEN, S.S. Polyunsaturated fatty acid nutrition in juvenile freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**, v.114, p. 63-86, 1993.
- DA SILVA, R.R.; SAMPAIO, C.M.S.; SANTOS, J.A. Fecundity and fertility of *Macrobrachium amazonicum* (Crustacea, Palaemonidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, p. 489-500, 2004.
- DALIMATA, A.M.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with threhalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, v.48, p. 831-841, 1997.
- DAMRONGPHOL, P.; AKARASANON, K. Techniques for cryopreservation of spermatophores of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). In: CABRITA, E.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, P. **Methods in Reproductive Aquaculture. Marine and Freshwater Species**. Boca Ratón, FL, CRC Press, 2008. p.509-514.
- De GRAVE, S.; CAI, Y.; ANKER, A. Global diversity of shrimps (Crustacea:Decapoda:Caridae) in freshwater. **Hydrobiologia**, v.595, p. 287-293, 2008.
- De GRAVE, S.; PENTCHEFF, N.D.; AHYONG, S.T.; CHAN, T.Y.; CRANDALL, K.A.; DWORSCHAK, P.C.; FELDER, D.L.; FELDMANN, R.M.; FRANSEN, C.H.J.M.; GOULDING, L.Y.D.; LEMAITRE, R.; LOW, M.E.Y.; MARTIN, J.W.; NG, P.K.L.; SCHWEITZER, C.E.; TAN, S.H.; TSHUDY, D.; WETZER, R. A classification of living and fossil genera of Decapod Crustaceans. **Raffles Bulletin of Zoology**, supplement 21, p. 1-109, 2009.
- De LEEUW, F.E.; De LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.G.; COLENBRANDER, D.; VERKLEIJ, A.J. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. **Cryobiology**, v.30, p. 32-44, 1993.
- DENNISTON, R.; MICHELET, S.; GODKE, R.A. Principles of cryopreservation. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. (Eds.) **Cryopreservation in aquatic species**. World Aquaculture Society: Baton Rouge, cap.2, 2000. p. 59-74.
- Di MATTEO, O.; LANGELLOTTI, A.L.; MASULLO, P.; SANSONE, G. Cryopreservation of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) spermatozoa. **Cryobiology**, v.58, p.145-150, 2009.
- DÍAZ, A.C.; FERNANDEZ-GIMENEZ, A.V.; HARÁN, N.S.; FENUCCI, J.P. Reproductive performance of male Argentine red shrimp *Pleoticus muelleri* Bate (Decapoda, Penaeoidea) in culture conditions. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.32, p. 236-242, 2001.

DÍAZ, A.C.; FERNANDEZ-GIMENEZ, A.V.; PETRIELLA, A. M.; FENUCCI, J.P. Morphological and functional study of the male reproductive tract in the shrimp *Pleoticus muelleri* Bate (Decapoda, Panoeoidea). **Invertebrate Reproduction and Development**, v.42, p. 69-74, 2002a.

DÍAZ, F.; SIERRA, E; RE, A.D.; RODRÍGUEZ, L. Behavioral thermoregulation and critical thermal limits of *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann). **Journal of Thermal Biology**, v. 27, p. 423-428, 2002b.

DIGMAYER, M. **Viabilidade de embriões de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), submetidos a -8°C e diferentes concentrações de crioprotetores**. 2010. 46p. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas). Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR/Brasil, 2010.

DIWAN, A.D.; JOSEPH, S. Cryopreservation of spermatophores of the marine shrimp, *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. **Indian Journal of Fisheries**, v.46, p. 159-166, 1999.

DONG-HUA, C.; YAN-DONG, L.; LIN-ZHI, J.; XIAO-BO, L.; LI-REN, W.; DI, Q.; QUN, W. Cryopreservation of *Eriocheir sinensis* sperms (*in vitro*) with different cryoprotective solutions and prefreezing time. **Acta Hydrobiologica Sinica**, v.32, p. 579-585, 2008.

DOUGHERTY, W. J; DOUGHERTY, M. M.; HARRIS, S.G. Ultrastructural and histochemically observations on electroejaculated spermatophores of the palaemonid shrimp *Macrobrachium rosenbergii*, **Tissue & Cell**, v. 18, p. 709-724, 1986.

ELMOR, M.R.D.; LOBÃO, V.L.; VALENTI, W.C. Consumo de oxigênio por *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) como subsídio ao seu transporte e cultivo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.8 (único), p. 65-78, 1981.

FABBROCINI, A.; D'ADAMO, R. Gamete maturation and gonad growth in fed and starved sea urchin *Parecentrotus lividus* (Lamarck, 1816). **Journal of Shellfish Research**, v.29, p.1051-1059, 2010.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. **Cryobiology**, v. 23, p. 1-13, 1986.

FAHY, G.M. Cryoprotectant toxicity neutralization. **Cryobiology**, v. 60, p. 45-53, 2010.

FAHY, G.M.; LILLEY, T.H.; LINSDELL, H.; DOUGLAS, M.St.J.; MERYMAN, H.T. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. **Cryobiology**, v.27, p.247-268, 1990.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. State of art in the management of animal genetic resource. Method for conservation. In: Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Food & Agriculture Organization on the United Nations (Eds.). **The State of the world's Animal Genetic Resources for food and Agriculture**. Rome Italy. 2007. p. 443-475.

FAO. Fishery Statistical Databases (Fishstat Plus, atualizado em 2014). Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/statistics/programme/3,1,1,>>. Acesso em: 5 fev. 2015.

FAO. Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/culturedspecies>>. Acesso em: 18 mai. 2013.

FONSECA, K.M.L. **Camarões (Atyidae e Palaemonidae) da rede fluvial do Estado do Rio de Janeiro: sistemática e distribuição**. 1995. 85p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica/RJ/Brasil, 1995.

FONSECA, M.A. **Análise do perfil lipídico do sêmen bovino**. 2012. 64p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo/São Paulo/Brasil, 2012.

FONTELES-FILHO, A. A. **Oceanografia, biologia e dinâmica populacional de recursos pesqueiros**. 1ª Edição. Expressão gráfica, Fortaleza, 464p. 2011.

FREIRE, J.L.; MARQUES, C.B.; SILVA, B.B. Estrutura populacional e biologia reprodutiva do camarão-da-amazônia *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda:Palaemonidae) em um estuário da região nordeste do Pará, Brasil. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v.16, p. 65-76, 2012.

GARCÍA-DÁVILA, C.R.; ALCANTÁRA B., F.; VASQUEZ R., E.; CHUJANDAMA S., M. Biologia reprodutiva do camarão *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862) (Crustacea:Decapoda:Palaemonidae) em igarapés de terra firme da Amazônia Peruana. **Acta Amazonica**, v.30, p. 653-664, 2000.

GARCÍA-GUERRERO, M.U.; BECERRIL-MORALES, F.; VEGA-VILLASANTE, F.; ESPINOSA-CHAURAND, L.D. Los langostinos del género *Macrobrachium* con importancia económica y pesquera en América Latina: conocimiento actual, rol ecológico y conservación. **Latin American Journal of Aquaculture Research**, v.41, p. 651-675, 2013.

GASCA-LEYVA, J.F.E.; MARTINEZ-PALACIOS, C.A.; ROSS, L.G. The respiratory requirements of *Macrobrachium acanthurus* (Wiegman) at different temperatures and salinities. **Aquaculture**, v.93, p. 191-197, 1991.

GASTELÚ, J.C.; OLIVEIRA, J.; BRITO, L.O.; GALVEZ, A.O.; MOREIRA, M.G. Efeito da temperatura e dos alimentos protéico e lipídico nos estádios de maturação ovariana e estágios de muda do *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836). **Ciência Animal Brasileira**, v.12, p.443-455, 2011.

GASTELÚ, J.C.; OLIVEIRA, J. Cultivo de crustáceos: os camarões-d'água-doce. In: VINATEA ARANA, L. (Org.) **Fundamentos de Aqüicultura**. Florianópolis: Ed. UFSC, 2004. 349p.

GLENCROSS, B.D. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. **Reviews in Aquaculture**, v.1, p.71-124, 2009.

GOIMIER Y., PASCUAL C., SANCHEZ A., GAXIOLA G., SÁNCHEZ A. e ROSAS C. Relation between reproductive, physiological, and immunological condition of *Litopenaeus setiferus* pre-adult males fed different dietary protein levels (Crustacea; Penaeidae). **Animal Reproduction Science**, v.92, p. 193-208, 2006.

GOLDBERG, R.S. **Comparação da eficiência da eletroejaculação entre tipos morfológicos de macho e manejos de criopreservação espermática do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii***. 1998. 41p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal Rural do Rio Janeiro, Seropédica/RJ/Brasil, 1998.

GOLDBERG, R.S.; OSHIRO, L.M.Y. Eficiência da eletroejaculação de morfotipos machos do camarão-de-água-doce *Macrobrachium rosenbergii*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.1-5, 2000.

GONZÁLEZ-BARÓ, M.R.; POLLERO, R.J. Fatty acid metabolism of *Macrobrachium borelli*: dietary origin of arachidonic acid and eicosapentaenoic acid. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A**, v.119, p. 747-752, 1998.

GRAZIANI, C.; MORENO, C.; VILLARROEL, E.; ORTA, T.; LODEIROS, C.; DE DONATO, M. Hybridization between the freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) and *M. carcinus* (L.). **Aquaculture**, v.217, p. 81-91, 2003.

GREEN, R.E. **Princípios e técnicas da vitrificação de embriões dos animais domésticos**. 2005. 21p. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual Paulista, Botucatu/SP/Brasil, 2005.

GWO, J.C. Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review. **Aquaculture Research**, v.31, p. 259-271, 2000.

GWO, J.C.; LIN, C.H. Preliminary experiments on the cryopreservation of Penaeid shrimp (*Penaeus japonicus*) embryos, nauplii and zoea. **Theriogenology**, v.49, p.1289-1299, 1998.

GWO, J.C.; CHEN, C.W.; CHENG, H.Y. Semen cryopreservation of small abalone (*Haliotes diversicolor supertexta*). **Theriogenology**, v.58, p.1563-1578, 2002.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 6. ed. São Paulo: Ed.Manole. 582p. 1995.

HAMMERSTED, R.H.; GRAHAN, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v.11, p.73-88, 1990.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAN, J.K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. **Cryobiology**, v.29, p.26-38, 1992.

HANADA, A.; NAGASE, H. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. **Journal Reproduction of Fertility**, v.60, p. 247-252. 1980.

HARLIOĞLU, M.M.; KÖPRÜCÜ, K.; HARLIOĞLU, A.G.; YONAR, S.M.; DURAN, T.Ç.; ÇAKMAK, M.N.; AKSU, Ö; ÖZKAN, S.; KUTLUYER, F.; GÜNDOĞDU, H. Effect of dietary n-3 series fatty acids on sperm production in the freshwater crayfish, *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz) (Astacidae). **Aquaculture International**, v.21, p. 273-282, 2013.

HARRIS, S.E.G.; SANDIFER, P.A. Sperm production and the effects of the electrically induced spermatophore expulsion in the prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). **Journal of Crustacean Biology**, v.6, p. 633-647, 1986.

HARRISON, K. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans. A review. **Journal of Shellfish Research**, v.9, p. 1-28, 1990.

HARRISON K. Broodstock nutrition and maturation diets. In: D'ABRAMO, L.R.; CONKLIN, D.E.; AKIYAMA, D.M. (Eds.) **Crustacean nutrition. Advances in World Aquaculture**. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA. 1997. p. 390-408.

HARVEY, B.; ASHWOOD-SMITH, M.J. Cryoprotectant penetration and supercooling in the eggs of salmonid fishes. **Cryobiology**, v.19, p. 29-40, 1982.

HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. Preservation of sperm. In: HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. (Eds.) **Induced breeding in tropical fish culture**. Ottawa: International Development Research Center. 1993. p. 119-130.

HAYD, L.; ANGER, K. Reproductive and morphometric traits of *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda: Palaemonidae) from the Pantanal, Brazil, suggests initial speciation. **Revista de Biologia Tropical**, v. 61, p. 39-57, 2013.

HINSCH, G.W. Arthropoda - Crustacea: Sexual Behavior and Receptivity. In: ADTYODT, K.G; ADIYODI, R.G. (Eds). **Reproductive Biology of Invertebrates**. New York, John Wiley & Sons, vol. 5, 1992. XXIII+511p.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual references. **Theriogenology**, v.53, p.47-58, 2000.

HOLT, W.V.; HEAD, M.F.; NORTH, R.D. Freeze-induced membrane in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. **Biology of Reproduction**, v.43, p.1086-1094, 1992.

HOLTHUIS, L.B.; NG, P.K.L. Nomenclature and Taxonomy. In: NEW, M.B., VALENTI, W.C.; TIDWELL, J.H.; D'ABRAMO, L.R.; KUTTY, M.N. (Eds.) **Fresh water prawn: biology and farming**. London: Blackwell Publishing Ltd., 2010. p. 12-17.

HUANG, X.; ZHUANG, P.; ZHANG, L.; YAO, Z.; LIU, T.; LIU, J.; FENG, G. Effects of cryoprotectant toxicity on embryos of the Chinese Mitten Crab, *Eriocheir sinensis* (Decapoda, Brachyura). **Crustaceana**, v.84, p. 281-291, 2011.

IGARASHI, M.A. Cultivo de siri: perspectivas para o pequeno criador. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais**, v.7, p. 455-467, 2009.

IKA WERKE. **Ika calorimeter system C 2000 operating instructions**. U.S.A., 2007.

ISHIDA, T.; TALBOT, P.; KOODA-CISCO, M. Technique for the long-term storage of lobster (*Homarus*) spermatophores. **Gamete Research**, v. 14, p. 183-195, 1986.

JALIHAL, D.R., SANKOLL, K.N.; SHENOY, S. Evolution of larval developmental patters and the process of freshwaterization in the prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae). **Crustaceana**, v.65, p. 365-376, 1993.

JERRY, D.R. Electrical stimulation of spermatophore extrusion in the freshwater yabby (*Cherax destructor*). **Aquaculture**, v.200, p. 317-322, 2001.

JEYALACTUMIE, C.; SUBRAMONIAM, T. Cryopreservation of spermatophores and seminal plasma of the edible crab *Scylla serrata*. **Biological Bulletin**, v.177, p. 247-253, 1989.

KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.67-75, 1996.

KEITH, S. L. **Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa**. 1998. 104p. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Colorado State University Fort Collins, Colorado/EUA, 1998.

KOODA-CISCO, M.J.; TALBOT, P. A technique for electrically stimulating extrusion of spermatophores from the lobster, *Homarus americanus*. **Aquaculture**, v.30, p. 221-227, 1983.

KUNDU, C. N.; CHAKRABORLTY, J.; DUTTA, P.; BHATTACHARYYA, D.; GHOST, A.; MAJUNDER, G. C. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemical defined medium and the goat caudal epididymal spermatozoa. **Cryobiology**, v.40, p.117-125, 2000.

LAPA-GUIMARÃES, J.; FELÍCIO, P.E.; CONTRERAS GUZMÁN, E.S. Chemical and microbial analysis of squid muscle (*Loligo plei*) during storage in ice. **Food Chemistry**, v.91, p. 477-483, 2005.

LEAT, W.M.F.; NORTHOP, C.A.; HARRISON, F.A.; COX, R.W. Effect of linoleic acid and linolenic acid on testicular developments in the rat. **Quaterly Journal of Experimental Physiology**, v.68, p. 221-231, 1983.

LEELATANAWIT, R.; UAWISETWATHANA, U.; KHUDET, J.; KLANCHUI, A.; PHOMKLAD, S.; WONGTRIPOP, S.; ANGTHOUNG, P.; JIRAVANICHPAISAL, P.; KAROONUTHAISIRI, N. Effects of polychaetes (*Perinereis nuntia*) on sperm performance of the domesticated black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture**, v.433, p. 266-275, 2014.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of biochemistry**. 4th ed. New York: Worth Publishers. 1100p. 2006.

LEITE, T.G., VALE FILHO, V.R.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; EMERICK, L.L.; ZAFFALON, F.G.; MARTINS, J.A.; de ANDRADE, V.J. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v. 120, p. 31-8, 2010.

LEUNG-TRUJILLO, J.R.; LAWRENCE, A.L. Observations on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions. **Aquaculture**, v.3-4, p.363-370, 1987.

LEZCANO, M.; GRANJA, C.; SALAZAR, M. The use of flow cytometry in the evaluation of cell viability of cryopreserved sperm of the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Cryobiology**, v.48, p.349-356, 2004.

LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; MENDEZ, L.D.V.; POVEDA-PARRA, A.R. A aquicultura no mundo. In: LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; MENDEZ, L.D.V. e POVEDA-PARRA, A.R. (Eds.) **Produção de organismos aquáticos: uma visão geral no Brasil e no mundo**. Guaíba/RS: Agrolivros, cap 1, 2011, p. 13-96.

LUNA, M.; GRAZIANI, C.; VILLARROEL, E.; LEMUS, M.; LODEIROS, C.; SALAZAR, G. Evaluación de tres dietas con diferente contenido proteico en el cultivo de postlarvas del langostino de río *Macrobrachium rosenbergii*. **Zootecnia Tropical**, v.25, p.111-121, 2007.

LYNN, J.W.; CLARK Jr., W.H. The fine structure of the mature sperm of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Biological Bulletin**, v.164, p.459-470, 1983.

MA, W.M.; QIAN, Y.Q.; WANG, M.R.; YANG, F.; YANG, W.J. A novel terminal ampullae peptide is involved in the proteolytic activity of sperm in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Reproduction**, v.140, p. 235-245, 2010.

MADEIRA, V.L.H.; MONTEIRO, C.L.B.; BARBOSA, C.C. Efeito de diferentes protocolos de descongelação sobre o sêmen canino criopreservado em diluidor à base água de coco em pó (ACP-106®). **Ciência Animal Brasileira**, v.11, p. 845-852, 2010.

MAÑANÓS, E.; DUNCAN, N.; MYLONAS, C. Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning cultured fish. In: CABRITA, E.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, P. **Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species**, Boca Ratón, FL, CRC Press, 2008. p. 3-80.

MANTELATTO, F.L.M.; BARBOSA, L.R. Population structure and relative growth of freshwater prawn *Macrobrachium brasiliense* (Decapoda, Palaemonidae) from São Paulo State, Brazil. **Acta Limnológica Brasileira**, v.17, p. 245-255, 2005.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; DIOGO, P.; DINIS, M.T.; HERRÁEZ, M.P.; SARASQUETE, C.; CABRITA, E. Sea bass sperm freezability is influenced by motilities variables and membrane lipid composition but not by membrane integrity and lipid peroxidation. **Animal Reproduction Science**, v.131, p.211-218, 2012.

MARTÍNEZ-PASTOR, F.; ADAMS, S.L. Cryobiological material and handling procedures. In: CABRITA, E.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, P. (Eds.) **Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species**. Boca Ratón, FL, CRC Press, 2008. p. 295-319.

MARTINS, C.F.; DODE, M.N.; GUIMARÃES Jr., R.; BÁO, S.N.; SERENO, J.R.B.; RUMPF, R. **Conservação de espermatozoides bovinos por liofilização (freeze-drying)**. Doc. Técnicos 216, Embrapa Cerrados, 30p, 2008.

- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology – Cell Physiology**, v.247, p. 125-142, 1984.
- MAZUR, P.; LEIBO, S.P.; CHU, E.H. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. **Experimental Cell Research**, v.71, p.345-355, 1972.
- MASSOLIN, E.C.; BUENO, S.L.S. Reproductive biology of *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae) in São Sebastião, Brazil. **Journal of Crustacean Biology**, v.22, p. 367-371, 2002.
- McLAUGHLIN, E.A.; FORD, W.C.L.; HULL, M.G.R. The contribution of the toxicity of a glycerol-egg yolk-citrate cryopreservative to the decline in human sperm motility during cryopreservation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.95, p.749-754, 1992.
- MEDEIROS, C.M.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't better. **Theriogenology**, v. 57, p. 327-344, 2002.
- MEJÍA-ORTÍZ, L.M.; ALVAREZ, F.; ROMÁN, R.; VICCON-PALE, J.A. Fecundity and distribution of freshwater prawns of the genus *Macrobrachium* in the Huitzilapan river, Veracruz, México. **Crustaceana**, v.74, p. 69-77, 2001.
- MELO, G.A.S. Família Palaemonidae. In: MELO, GAS. (Ed.) **Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil**. São Paulo: Loyola, 2003. p. 317-398.
- MEMON, A.J.; IKHWANUDDIN, M.; TALPUR, A.D.; KHAN, M.I.; FARIDDUDIN, M.O.; SAFIAH, J.; ABOL-MUNAFI, A.B. To determine the efficiency of different fresh diets in improving the spermatophore quality of banana shrimp *Penaeus merguensis* (De Man, 1888). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.11, p. 1478-1485, 2012.
- MERYMAN, H.T.; WILLIAMS, R.J.; DOUGLAS, M.St.J. Freezing injury from “solution effects” and its prevention by natural or artificial cryoprotection. **Cryobiology**, v. 14, p. 287-302, 1977.
- MEUNPOL, O., MEEJING, P., PIYATIRATITIVORAKUL, S. Maturation diet based on fatty acid content for male *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. **Aquaculture Research**, v.36, p. 1216-1225, 2005.
- MORAES, C.N.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, J.F.C.; SCHWEITZER, C.M. Criopreservação do sêmen ovino em pellets com etilenoglicol. **Ciência Rural**, v.28, p. 287-292, 1998.
- MOREIRA, G.S.; McNAMARA, J.C.; MOREIRA, P.S. The effect of salinity on the upper thermal limits of survival and metamorphosis during larval development in *Macrobrachium amazonicum* (Heller) (Decapoda, Palaemonidae). **Crustaceana**, v.50, p. 231-328. 1986.
- MOSSOLIN, E.C.; PILEGGI, L.G.; MANTELATTO, F.L. Crustacea, Decapoda, Palaemonidae, *Macrobrachium* Bate, 1868, São Sebastião Island, State of São Paulo, southeastern Brazil. **Journal of species lists and distribution**, v. 6, p. 605-613, 2010.

- MULLER, K.; MULLER, P.; PINCEMY, G.; KURZ, A.; LABBE, C. Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.78, p. 390-399, 2008.
- MÜLLER, Y.M.; BRESSAN, C.M.; NAZARI, E.M. Dados de fecundidade de *Macrobrachium acanthurus* (Decapoda, Palaemonidae) do rio Capivari, Praia dos Ingleses, Florianópolis/SC. **Biotemas**, v.5, p. 123-132, 1992.
- MÜLLER, Y.M.R.; NAZARI, E.M.; BRESSAN, C.M.; AMMAR, D. Aspectos da Reprodução de *Palaemon pandafjormis* (Stimpson) (Decapoda, Palaemonidae) no Manguezal de Ratoles, Santa Catarina. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.13, p. 633-642, 1996.
- MÜLLER, Y.M.R.; NAZARI, E.M.; AMMAR, D.; FERREIRA, E.C.; BELTRAME, I.T.; PACHECO, C. Biologia dos Palaemonidae (Crustacea, Decapoda) da baía hidrográfica de Ratoles, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.16, p. 629-636, 1999.
- NASIRI, A.H.; TOWHIDI, A.; ZEINOALDINI, S. Combined effect of DHA and  $\alpha$ -tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. **Andrologia**, v.44 (supl.1), p.550-555, 2012.
- NEW, M.B. Freshwater prawn farming: global status, recent research and a glance at the future. **Aquaculture research**, v.36, p. 210-230, 2005.
- NEWTON, S.S.; SUBRAMONIAM, T. Cryoprotectant toxicity in Penaeid prawn embryos. **Cryobiology**, v.33, p.172-177, 1996.
- NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, v.35, p.109-124, 1991.
- NIMRAT, S.; SIRIBOONLAMOM, S.; ZHANG, S.; XU, Y.; VUTHIPHANDCHAI, V. Chilled storage of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) spermatophores. **Aquaculture**, v.261, p. 944-951, 2006.
- OGLE, J.T. A review of the current (1992) state of our knowledge concerning reproduction in open thelycum Penaeid shrimp with emphasis on *Penaeus vannamei*. **Invertebrate Reproduction and Development**, v.22, p. 267-274, 1992.
- OKUMURA, T.; HARA, M. Androgenic gland cell structure and spermatogenesis during the molt cycle and correlation to morphotypic differentiation in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Zoological Science**, v.21, p. 621-628, 2004.
- OKUNO, A.; HASEGAWA, Y.; NISHIYAMA, M.; OHIRA, T.; KO, R.; KURIHANA, M.; MATSUMATE, S.; NAGASAWA, H. Preparation of an active recombinant peptide of crustacean androgenic gland hormone. **Peptides**, v.23, p. 567-572, 2002.

- PANIAGUA-CHAVEZ, C.G.; TIERSCH, T.R. Laboratory studies of cryopreservation of sperm and trochophore larvae of the Eastern oyster. **Cryobiology**, v.43, p.211-223, 2001.
- PANIAGUA-CHAVEZ, C.G.; ORTIZ-GALLARZA, S.M.; AGUILAR-JUÁREZ, M. Subsistema nacional de recursos genéticos acuáticos: uso de la criopreservación para la conservación de los recursos genéticos acuáticos en México. **Hidrobiológica**, v.21, p. 415-429, 2011.
- PAPA, L.P. **Aspectos estruturais dos testículos dos diferentes morfotipos de *Macrobrachium amazonicum* arraçoados com dietas contendo diferentes níveis de colesterol**. 2003. 81p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Universidade Estadual Paulista, Caunesp, Jaboticabal/SP/Brasil, 2003.
- PAPA, L.P. **Caracterização estrutural do sistema reprodutor masculino e do hepatopâncreas dos diferentes morfotipos de *Macrobrachium amazonicum***. 2007. 94p. Tese (Doutorado em Aquicultura). Universidade Estadual Paulista, Caunesp, Jaboticabal/SP/Brasil, 2007.
- PARKS, E.J.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranas. **Theriogenology**, v.38, p. 209-222, 1992.
- PASCUAL, C., SÁNCHEZ, A., SÁNCHEZ, A., VARGAS-ALBORES, F., LEMOULLAC, G., ROSAS, C. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. **Aquaculture**, v. 218, p. 637-650, 2003.
- PASCUAL, C.; VALERA, E.; RE-REGIS, C.; GAXIOLA, G.; SANCHEZ, A.; RAMOS, L.; SOTO, L.A.; ROSAS, C. Effect of water temperature on reproductive tract condition of *Penaeus setiferus* adult males. **Journal of Aquaculture Society**, v.29, p. 477-484, 1998.
- PEIXOTO, S.; CAVALLI, R.O.; WASIELESKY, W.; D'INCAO, F.; KRUMMENAUER, D.; MILACH, A.M. Effects of age and size on reproductive performance of captive *Farfantepenaeus paulensis* broodstock. **Aquaculture**, v.238, p. 173-182, 2004.
- PEÑA, A.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, p. 859-875, 2000.
- PEREZ-VELAZQUEZ, M.; BRAY, W.A.; LAWRENCE, A.L.; GATLIN, D.M.; GONZÁLEZ-FÉLIX, M.L. Effect of temperature on sperm quality of captive *Litopenaeus vannamei* broodstock. **Aquaculture**, v.198, p. 209-218, 2001.
- PEREZ-VELAZQUEZ, M.; LAWRENCE, A.L.; GATLIN, D.M.; GONZÁLEZ-FÉLIX, M.L.; BRAY, W.A. Replacement of fresh dietary components by a dry feed for successful maturation of male *Litopenaeus vannamei* (Boone) broodstock. **Aquaculture Research**, v.33, p. 1901-1905, 2002.

PEREZ-VELAZQUEZ, M.; GONZÁLEZ-FÉLIX, M.L.; LAWRENCE, A.L.; BRAY, W.A.; GATLIN, D.M. Dietary effects on sperm quality of *Litopenaeus vannamei* broodstock. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.34, p. 92-98, 2003.

POLJAROEN, J.; VANICHVIRIYAKIT, R.; TINIKUL, Y.; PHOUNGPETCHARA, I.; LINTHONG, V.; WEERACHATYANUKUL, W.; SOBHON, P. Spermatogenesis and distinctive mature sperm in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). **Zoologischer Anzeiger**, v.249, p.81-94, 2010.

PRATOOMCHAT, B.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; MENASVETA, P.; FAST, A.W. Sperm quality of pond-reared and wild-caught *Penaeus monodon* in Thailand. **Journal of World Aquaculture Society**, v.24, p. 530-540, 1993.

QUADROS, M.L.A.; MACIEL, C.; BASTOS, S.; SAMPAIO, I. Reprodução do camarão canela *Macrobrachium acanthurus* em condições controladas de laboratório e montagem de um atlas para identificação de estágios larvais. **Revista Científica da UFPA**, v.4, p. 1-11, 2004.

QUIJADA, A.; PEREIRA, G. Análisis comparativo de la dieta de tres especies de camarones del género *Macrobrachium* (Crustacea: Palaemonidae) de Venezuela. **Acta Científica Venezolana**, v.41 (supl. 1), p. 381, 1990.

RAPATZ, G. Cryoprotective effect of methanol during cooling of frog hearts. **Cryobiology**, v.10, p. 181-184, 1973.

RIBEIRO, K.; FRANCESCHINI-VICENTINI, I.B.; PAPA, L.P.; NEW, M.B.; VALENTI, W.C. Effect of polyunsaturated fatty acids on the fecundity of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). **Aquaculture Research**, v.43, p. 1756-1763, 2012.

ROBERTSON, L.; WATSON, P.F. Calcium transport in diluted or cooled ram semen. **Journal Reproduction and Fertility**, v.77, p.177-185, 1986.

ROSAS, C.; SANCHEZ, A.; CHIMAL, M.A.E.; SALDANA, G.; RAMOS, L.; SOTO, L.A. The effect of electrical stimulation on spermatophore regeneration in white shrimp *Penaeus setiferus*. **Aquatic Living Resources**, v.6, p.139-144, 1993.

SAGI, A.; MILNER, Y.; COHEN, D. Spermatogenesis and sperm storage in the testes of the behaviorally distinctive male morphotypes of *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda, Palaemonidae). **Biological Bulletin**, v.174, p. 330-336, 1988.

SAGI, A.; MILSTEIN, A.; ERAN, Y.; JOSEPH, D.; KHALAILA, I.; ABDU, U.; HARPAZ, S.; KARPLUS, I. Culture of the Australian red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) in Israel: Second grow out season of over wintered population. **Israeli Journal of Aquaculture**, v.49, p.222-229, 1997.

- SALAZAR, M.; LEZCANO, M.; GRANJA, C. Protocol for cryopreservation of *Penaeus vannamei* sperm cells. In: CABRITA, E.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, P. (Eds.) **Methods in Reproductive Aquaculture. Marine and Freshwater Species**. Boca Ratón, FL, CRC Press, 2008. p.505-508.
- SALINAS-FLORES, L.; PANIAGUA-CHAVES, C.G.; JENKINS, J.A.; TIERSCH, T.R. Cryopreservation of sperm of red abalone (*Haliotes rufescens*). **Journal of Shellfish Research**, v.24, p.415-420, 2005.
- SAMPAIO, C.M.S.; SILVA, R.R.; SANTOS, J.A.; SALES, S.P. Reproductive cycle of *Macrobrachium amazonicum* females (Crustacea, Palaemonidae). **Brazilian Journal of Biology**, v.67, p. 551-559, 2007.
- SAMUEL, M.J.; KANNUPANDI, T. Y SOUNDARAPANDIAN, P. Nutritional effects on male reproductive performance in the freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* (H. Milne Edwards). **Aquaculture**, v.172, p. 327-333, 1999.
- SÁNCHEZ, A.; PASCUAL, C.; SANCHEZ, A.; VARGAS-ALBORES, F.; MOULLAC, G.L.; ROSAS, C. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. **Aquaculture**, v.198, p. 13-28, 2001.
- SANDIFER, P.A.; LYNN, J.W. Artificial insemination of caridean shrimp. In: CLARK Jr., W.H. e ADAMS, T.S. (Eds.). **Advances in invertebrate reproduction**. Elsevier North Holland, Inc, 1980. p. 271-288.
- SANDIFER, P.A.; SMITH, T.I.J. A method for artificial insemination of *Macrobrachium* prawns and its potential use in inheritance and hybridization studies. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.10, p. 403-418, 1979.
- SANDIFER, P.A., LAWRENCE, A.L.; HARRIS, S.G. Electrical stimulation of spermatophore expulsion in marine shrimp, *Penaeus* spp. **Aquaculture**, v.41, p. 181-187, 1984.
- SANTOS, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12 (Ed. especial), p.70-84, 2000.
- SASIKALA, S.L.; MEENA, B. Cryopreservation of semen from edible rock lobster, *Panulirus homarus*. **Cell & Tissue**, v.9, p.1999-2003, 2009.
- SHAILENDER, M.; SURESH BABU, CH.; KRISHNA, P.V. Determine the competence of different fresh diets to improve the spermatophore superiority of giant black tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798). **International Journal of Bioassays**, v.1, p.170-176, 2012.
- SHORT, J.W. A revision of Australian river prawn, *Macrobrachium* (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). **Hydrobiologia**, vol. 525, p. 1-110, 2004.

SICCARDI III, A.J.; LAWRENCE, A.L.; GATLIN III, A.M.; FOX, J.M.; PÉREZ-VELAZQUEZ, M.; GONZÁLEZ-FÉLIX, M.L. 2006. Digestibilidad aparente de energía, proteína y materia seca de ingredientes utilizados para el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*. In. CRUZ SUÁREZ, L.E.; MARIE, D.R.; SALAZAR, M.T.; NIETO LÓPEZ, N.G.; CAVAZOS, D.A.V.; CRUZ, A.C.P.; ORTEGA, A.G. (Eds.). **Avances en nutrición acuícola VIII**. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5.

SIQUEIRA, J.B. **Relação da fertilidade de sêmen bovino congelado com testes de avaliação espermática “in vitro”**. 2004. 77p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa/MG/Brasil, 2004.

SIKORSKI, Z.; KOLODZIEJSKA, I. The composition and properties of squid meat. *Food Chemistry*, v.20, p. 213-224, 1986.

SODESQUIST, L.; MADRID-BURY, N.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assesment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology*, v.48, p. 1115-1125, 1997.

SOJKA, E.J., BRISSON-KIMMICK, S.V., CARLSON, G.P.; COPPOC, G.L. Dimethyl sulfoxide update: New applications and dosing methods. *American Association of Equine Practitioners*, v.36, p.683-690, 1990.

SOUNDARAPANDIAN, P.; KANNUPANDI, T. Larval production by crossbreeding and artificial insemination of freshwater prawn. *Indian Journal of Fisheries*, v.47, p. 97-101, 2000.

SOUZA, M. L.; MOULTON, T. P. The effects of shrimp on benthic material in a Brazilian island stream. *Freshwater Biology*, v.50, p. 592-602, 2005.

SPINDLER, R.; ROSENHAHN, B.; HOFMANN, N.; GLASMACHER, B. Video analisys of osmotic cell response during cryopreservation. *Cryobiology*, v.64, p. 250-260, 2012.

STOREY, K.B.; STOREY, J.M. Natural freezing survival in animals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v.27, p. 365-386, 1996.

SUBRAMONIAM, T. Cryopreservation of crustacean gametes and embryos. *Proceedings of the Indian National Science Academy B*, v.60, p.229-236, 1994.

TACO – **Tabela brasileira de composição de alimentos/Nepa** – Unicamp. 4ª Ed., revisada e ampliada. Campinas: Nepa, Unicamp, 2011. 161 p.

TALBOT, P.; CHANMANON, P., The structure of sperm from the lobster, *Homarus americanus*. *Journal of Ultrastructure Research*, v.70, p. 275-286, 1980.

TAMBURUS, A.F.; MOSSOLIN, E.C.; MANTELATTO, F.L. Populational and reproductive aspects of *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) (crustacea: palaemonidae) from north coast of São Paulo state, Brazil. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*, v.16, p. 9-18, 2012.

TEIXEIRA, R.L.; SÁ, H.S. Abundância de macrocrustáceos decápodos nas áreas rasas do complexo lagunar Mundaú/Manguaba, AL. **Revista Brasileira de Biologia**, v.58, p. 393-404, 1998.

TERVIT, H.R.; ADAMS, S.L.; ROBERTS, R.D.; MCGOWAN, L.T.; PUGH, P.A.; SMITH, J.F.; JANKE, A.R. Successful cryopreservation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes. **Cryobiology**, v.51, p.142-151, 2005.

TIERSCH, T.R.; YANG, H.; JENKINS, J.A.; DONG, Q. Sperm cryopreservation in fish and shellfish. **Society for Reproduction and Fertility**, Suppl 65, p. 493-508, 2007.

TSAI, S.; LIN, C. Advantages and applications of cryopreservation in fisheries science. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.55, p. 425-433, 2012.

TORATI, L.; DE GRAVE, S.; PAGE, T.; ANKER, A. Atyidae and Palaemonidae (Crustacea: Decapoda: Caridea) of Bocas del Toro, Panama. **Check List**, v.7, p. 798-805, 2011.

UBERTI, M.F.; VIEIRA, F.N.; SALÊNCIA, H.R.; VIEIRA, G.S.; VIANTEA, L.A. Assessment of viability of sperm cells of *Litopenaeus vannamei* on cryopreservation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, p. 374-380, 2014.

VALENTI, W. C. **Cultivo de camarão de água doce**. São Paulo: Nobel, 82 p. 1985.

VALENTI, W.C. Comportamento reprodutivo de camarões de água doce. In: Encontro Anual de Etologia 5, Jaboticabal/SP. **Anais...** São Paulo, 1987, p. 195-202.

VALENTI, W.C.; MELLO, J.T.C.; LOBÃO, V.L. Dinâmica da reprodução de *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) e *Macrobrachium carcinus* (Linnaeus, 1758) do Rio Ribeira de Iguape (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). **Ciência e Cultura**, v.38, p.1256-1262, 1986.

VALENTI, W.C.; MELLO, J.T.C.; LOBÃO, V.L. Fecundidade em *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) do rio ribeira do Iguape (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.6, p. 09-15. 1989.

VASCONCELLOS, M.; HAIMOVICI, M. Status of white croaker *Micropogonias furnieri* exploited in southern Brazil according to alternative hypotheses of stock discreteness. **Fisheries Research**, v. 80, p. 196-202, 2006.

VERDI, A.; DELGADO, E. Microestrutura del aparato reproductor masculino de *Macrobrachium borellii* (Nobili, 1896) (Crustácea, Caridea, Palaemonidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v.58, p. 343-348, 1998.

VIANA, M.T. **Boletín informativo trimestral de la Sociedad Mexicana de Abulón**. Boletín I, año 9, 7p. 2007.

VUTHIPHANDCHAI, V.; NIMRAT, S.; KOTCHARAT, S.; BARTH, A.N. Development of a cryopreservation protocol for long-term storage of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatophores. **Theriogenology**, v.68, p.1192-1199, 2007.

WANG, H.; LI, X.; WANG, M.; CLARKE, S.; GLUIS, M.; ZHANG, Z. Effects of larval cryopreservation on subsequent development of the blue mussels, *Mytilus galloprovincialis* Lamarck. **Aquaculture Research**, v.42, p.1816-1823, 2011.

WANG, Q.Y.; MISAMORE, M.; JIANG, C.Q.; BROWDY, C.L. Egg water induced reaction and biostain assay of sperm from marine shrimp *Penaeus vannamei*: dietary effects on sperm quality. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.26, p.261-271, 1995.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p. 871-891, 1995.

WOLF, J.; BRYANT, G. Freezing, drying and/or vitrification of membrane-solute-water systems. **Cryobiology**, v.39, p.103-129, 1999.

WOUTERS, R., NIETO, J., SORGELOOS, P. Artificial diets for penaeids shrimp. **Global Aquaculture Advocate**, v.3, p. 61-62, 2000.

WOUTERS, R., LAVENS, P., NIETO, J., SORGELOOS, P. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. **Aquaculture**, v.202, p. 1-21, 2001.

WOUTERS, R.; ZAMBRANO, B.; ESPIN, M.; CALDERON, J.; LAVENS, P.; SORGELOOS, P. Experimental broodstock diets as partial fresh food substitutes in white shrimp *Litopenaeus vannamei* B. **Aquaculture Nutrition**, v.8, p. 249-256, 2002.

YANKSON, K.; MOYSE, J. Cryopreservation of the spermatozoa of *Crassostrea tulipa* and three other oysters. **Aquaculture**, v.97, p. 259-267, 1991.

ZARA, F.J.; TOYAMA, M.H.; CAETANO, F.H.; LÓPEZ-GRECO, L.S. Spermatogenesis, spermatophore, and seminal fluid production in the adult blue crab *Callinectes danae* (Portunidae). **Journal of Crustacean Biology**, v.32, p. 249-262, 2012.