

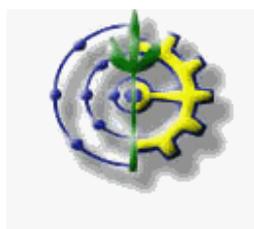
UFRRJ
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

TESE

**Morfologia e criopreservação do espermatozoide do camarão
branco *Litopenaeus schmitti* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae)**

Andrea Bambozzi Fernandes

2013



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

**MORFOLOGIA E CRIOPRESERVAÇÃO DO ESPERMATOZOIDE DO
CAMARÃO BRANCO *LITOPENAEUS SCHMITTI* (CRUSTACEA,
DECAPODA, PENAEIDAE)**

ANDREA BAMBOZZI FERNANDES

Sob a Orientação da Professora
Lidia Miyako Yoshii Oshiro

e Co-orientação do Professor
Marco Roberto Bourg de Mello

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
Março de 2013

595.3843

F363m

T

Fernandes, Andrea Bambozzi, 1973-
Morfologia e criopreservação do
espermatozoide do camarão branco
Litopenaeus Schmitti (Crustacea, Decapoda,
Penaeidae) / Andrea Bambozzi Fernandes. -
2013.
xii, 57 f.: il.

Orientador: Lidia Miyako Yoshii Oshiro.
Tese (doutorado) - Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-
Graduação em Zootecnia, 2013.

Bibliografia: f. 55-57.

1. Camarão - Espermatozoides - Teses.
2. Camarão - Reprodução - Teses. 3.
Camarão - Morfologia - Teses. 4. Camarão -
Histologia - Teses. 5. Penaeidae - 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**

ANDREA BAMBOZZI FERNANDES

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 01/03/2013



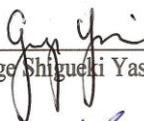
Lidia Miyako Yoshii Oshiro. Dr.^a. UFRRJ
(Orientadora)



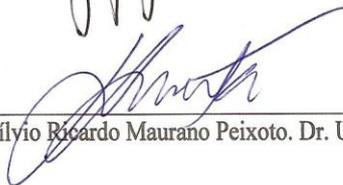
Karina Annes Keunecke. Dr.^a. UFRRJ



Simone Patricia Carneiro de Freitas. Dr.^a. FIOCRUZ



George Shiguetki Yasui. Dr. USP/ FZEA



Sílvio Ricardo Maurano Peixoto. Dr. UFRPE

DEDICATÓRIA

À Deus
Aos meus pais.

“A essência do conhecimento consiste em aplicá-lo, uma vez possuído.”

(Confúcio)

“Estudar é polir a pedra preciosa; cultivando o espírito purificamo-lo.”

(Confúcio)

“Ninguém cruza nosso caminho por acaso e nós não entramos na vida de alguém sem nenhuma razão.”

(Chico Xavier)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por mais esta etapa vencida, mais um degrau alcançado.

Aos meus pais Warner e Bernardete que mesmo estando longe sempre acreditaram em mim.

Aos meus irmãos Renata e Junior que sempre os amarei, não há dificuldade que não seja superada quando temos a união da família.

Ao meu marido Luiz que sempre esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis e pela paciência, dando-me o apoio necessário para que tudo fosse concluído.

Aos Professores Armando Sales e Aparecida do Nascimento do Departamento de Biologia Animal e Histologia da UFRRJ pelo auxílio na área de Histologia, pela compreensão e elucidações sobre o assunto. Pelo início de uma amizade e carinho. “Para conseguir a amizade de uma pessoa digna é preciso desenvolver em nós mesmos as qualidades que naquela admiramos” (Sócrates).

À Ilza Lucas Coelho Meirelles Assistente Técnica do Departamento de Biologia Animal e Histologia da UFRRJ pelo preparo do material histológico.

Ao Professor Dr. da Unesp, Fernando José Zara pelos ensinamentos, discussões e enriquecimento do trabalho. “A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original” (Albert Einstein).

À professora Jacenir Reis dos Santos Mallet e a pesquisadora Simone Patrícia Carneiro de Freitas da FIOCRUZ pelas imagens fotografadas da ultraestrutura do sistema reprodutor dos camarões machos. Pela paciência e amizade. “Amizade é quando você não faz questão de você e se empresta aos outros” (Adriana Falcão).

À minha grande amiga Luciana Almada Thomaz Gorini, que mesmo de longe nunca deixou de torcer por mim. Nas alegrias, nos momentos difíceis, muitos telefonemas ocorreram.

Às minhas grandes amigas Thaís e Angélica que conheci durante o Doutorado, pelas alegrias comemoradas juntas, longas conversas, apoio nos momentos de desespero e auxílio na tese, muito obrigada.

As amigades também realizadas durante esta jornada, Helaine, Michelle e Emanuela (Manu), obrigada por tudo.

Ao Tiago que nos momentos mais desgastantes da reta final deste doutorado me ajudou muito.

Aos estagiários Felipe, Régis, Olavo e Emanuela (na época ainda era estagiária, hoje mestranda) que sem a ajuda dos mesmos não seria possível a realização da criopreservação.

Aos amigos Denise, Juca, Sandra, Neno, Vanessa, Geraldo e Paulo que ao longo desta jornada torceram por mim.

À Senhora Cristiane pela ajuda no laboratório da Estação de Biologia Marinha e pelas longas e prazerosas conversas.

Aos professores Doutores Vinícius Pimentel Silva e Nivaldo de Faria Sant’Ana pelas análises estatísticas, muito obrigada.

Ao meu Co-orientador Marco Roberto Bourg de Mello pelos esclarecimentos durante a tese.

À minha Orientadora Lidia eu agradeço pela compreensão e aprendizado, um relacionamento de minha parte mais maduro com relação ao passado. Agradeço pela confiança depositada.

À REUNI/CAPES pela concessão da bolsa de estudos durante todo o período, pois sem esta seria inviável a realização deste trabalho.

RESUMO GERAL

FERNANDES, Andrea Bambozzi. **Morfologia e criopreservação do espermatozoide do camarão branco *Litopenaeus schmitti* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae)** 2013. 57f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

O camarão branco *Litopenaeus schmitti* ocorre no Atlântico Ocidental, das Antilhas ao Rio Grande do Sul, e é uma espécie de grande importância comercial para a região da Baía de Sepetiba - RJ. Este trabalho teve como principal característica analisar as secreções do vaso deferente e a viabilidade dos espermatozoides em camarões frescos e *post mortem* para utilização dos mesmos na reprodução. O primeiro estudo teve por objetivos comparar através da caracterização histológica a área dos túbulos seminíferos nas diferentes estações do ano; comparar histológica e histoquimicamente as secreções do vaso deferente (regiões proximal e médio) e da ampola terminal, assim como a ultraestrutura dos espermatozoides nestas regiões do camarão branco *L. schmitti* frescos e *post mortem*, caracterizar morfologicamente os espermatozoides através de microscopia eletrônica de transmissão e o sistema reprodutor pela microscopia eletrônica de varredura. Os animais foram oriundos da pesca comercial da baía de Sepetiba (Saco da Pombeba) latitude 23° 3'13.91"S e longitude 43°54'44.93"O. Foram comprados 21 machos adultos *post mortem* (aproximadamente a 48h), em cada estação, na primavera, verão, outono e inverno (totalizando 84 animais), e três machos adultos vivos (frescos) para cada estação do ano. A área do testículo se apresentou superior no verão indicando ser esta a época do ano de plena atividade reprodutiva e inferior no inverno, sugerindo ser este o período de repouso desta espécie na baía de Sepetiba - RJ. Por meio das análises histológicas e ultraestruturais dos espermatozoides do vaso deferente e da ampola terminal de animais *post mortem* constatou-se, que é possível a utilização dos espermatóforos destes machos para a inseminação de fêmeas, assim como para a criopreservação dos mesmos. As secreções presentes no vaso deferente médio, na ampola terminal e no lúmen dos espermatóforos possuem polissacarídeos e proteínas, o que indica que estas exercem as funções de proteção dos espermatozoides e fornecimento de substratos ricos em energia, aumentando o tempo de sobrevivência (viabilidade) dos mesmos na fêmea. O espermatozoide do camarão *L. schmitti* é composto por um corpo principal, a região acrossômica e o espinho de origem acrossomal. O segundo estudo foi dividido em dois ensaios, o primeiro teve por objetivo avaliar a viabilidade de dois protocolos de congelamento da massa espermática e do espermatóforo (utilizando Glicerol a 10%) e o segundo a eficiência de dois crioprotetores (Glicerol e DMSO a 10%) na criopreservação tanto da massa espermática, quanto do espermatóforo utilizando o melhor protocolo avaliado anteriormente. Foram utilizados um total de 55 camarões machos adultos (*post mortem*) para o primeiro experimento e 65 para o segundo. Os machos adultos foram adquiridos de maneira semelhante ao do primeiro estudo. O protocolo em que a temperatura apresentou queda de 0,5°C/min até atingir -32°C apresentou resultados satisfatórios para a criopreservação, entretanto, o protocolo que apresentou queda de 20°C/min até alcançar -120°C foi insatisfatório devido a baixa sobrevivência espermática. Tanto o Glicerol como o DMSO pode ser utilizado na criopreservação da massa espermática.

Palavras chave: Penaeidae, sistema reprodutor masculino, histologia, ultraestrutura, sazonalidade.

ABSTRACT

FERNANDES, Andrea Bambozzi. **Morphology and cryopreservation of sperm of white shrimp *Litopenaeus schmitti* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae)** 2013. 57f. Thesis (Doctor in Animal Science). Animal Science Institute, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

The white shrimp *Litopenaeus schmitti* occurs in the Western Atlantic, from the Caribbean to Rio Grande do Sul, and it is a species of great commercial importance to the region of Sepetiba Bay - RJ. This study was made to analyze the main feature secretions of the vas deferens and the sperm viability in fresh prawns and post mortem and their usefulness for reproduction. The first study aimed to compare through the histological characterization the area of the seminiferous tubules in different seasons; comparing histologically and histochemically the secretions of the vas deferens (the proximal and medial regions) and the terminal ampoule, as well as the ultrastructure of spermatozoa in the regions of the white shrimp *L. schmitti* fresh and *post mortem*, characterizing the morphology of the sperm through the transmission electron microscopy and the reproductive system through the scanning electron microscopy. The animals came from the commercial fishing of Sepetiba Bay (Saco da Pombeba) latitude 23 ° 3'13 .91 "S and longitude 43 ° 54'44 .93" W. 21 adult males were bought *post mortem* (approximately 48 hours), every season, spring, summer, autumn and winter (totaling 84 animals), and three living adult males (fresh) for each season. The area of the testicles appeared higher in summer indicating that this is the period of the year of full reproductive activity and lower in winter, suggesting that this is the resting period of this species in the Sepetiba Bay - RJ. Through histological and ultrastructural analysis of sperm vas deferens and terminal ampoule of animals *post mortem* it was found that it is possible to use these spermatophore males to inseminate females as well as for their cryopreservation. The secretions present in the medial vas deferens, terminal ampoule and lumen spermatophore possess polysaccharides and proteins, indicating that they exert protective functions of sperm and supply of energy-rich substrates, increasing their survival time (viability) in the female. The sperm of the shrimp *L. schmitti* is composed of the main body, the acrosomal region and the thorn source acrosomal. The second study was divided into two tests, the first was to evaluate the feasibility of two protocols of freezing sperm and spermatophore mass (using 10% Glycerol) and the second, the efficiency of two cryoprotectants (Glycerol and 10% DMSO) in both mass sperm cryopreservation, as the spermatophore using the best protocol previously evaluated. There has been used a total of 55 male adult shrimps (*post mortem*) for the first experiment and 65 for the second. Adult males were equally obtained as the ones from the first study. The protocol in which the temperature fell by 0.5°C/min to reach -32°C satisfactory results for cryopreservation, however, the protocol which fell 20°C/min to reach -120°C was unsatisfactory due to low sperm survival. Both Glycerol and DMSO may be used in cryopreservation of sperm mass.

Key words: Penaeidae, male reproductive system, histology, ultrastructure,

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I - Viabilidade do espermatozoide e influência da variação sazonal nos túbulos seminíferos do camarão branco *Litopenaeus schmitti* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae)

Figura 1. Sistema Reprodutor Masculino de camarões peneídeos.....	14
Figura 2. Morfologia externa do sistema reprodutor masculino do camarão branco <i>L. schmitti</i>	19
Figura 3. Ultraestrutura do petasma e da ampola terminal do camarão branco <i>Litopenaeus schmitti</i>	20
Figura 4. Espermatogênese de <i>L. schmitti</i> , corados com Hematoxilina-eosina (HE).....	22
Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura do sistema reprodutor do <i>L. schmitti</i>	24
Figura 6. Comparação histológica em HE e ultraestrutural de espermatozoides.....	25
Figura 7. Vaso deferente médio e ampola terminal.....	27

Capítulo II - Criopreservação da massa espermática e espermatóforo do camarão branco *Litopenaeus schmitti*

Figura 1. Medidas biométricas. Comprimento total (CT) e comprimento da carapaça (CC). 44	44
Figura 2. Esfregaço em lâmina da massa espermática do camarão <i>L. schmitti</i> , corado com eosina e nigrosina e observado em microscópio óptico em aumento 40x.....	45
Figura 3. Esquema do congelamento das massas espermáticas e espermatóforos.....	47
Figura 4. Tempo de criopreservação em Glicerol e DMSO sobre a sobrevivência espermática das massas mantidas por 30, 60 e 90 dias em nitrogênio líquido.....	49
Figura 5. Tempo de criopreservação em Glicerol e DMSO sobre a sobrevivência espermática dos espermatóforos (SPTF) mantidos por 30, 60 e 90 dias em nitrogênio líquido.	49
Figura 6. Porcentagem média de sobrevivência espermática das massas espermáticas e dos espermatóforos criopreservados em glicerol e DMSO a 10% por 30, 60 e 90 dias.....	50

LISTA DE TABELAS

Capítulo I - Viabilidade do espermatozoide e influência da variação sazonal nos túbulos seminíferos do camarão branco *Litopenaeus schmitti* (Crustacea, decapoda, penaeidae)

- Tabela 1.** Valores médios e desvio padrão da área dos túbulos seminíferos de *L. schmitti* na primavera, verão, outono e inverno. 21
- Tabela 2.** Valores médios e desvio padrão das células, espermatogônias, espermátócitos I e II, espermátides inicial, intermediária e final, no verão e inverno do camarão *L. schmitti*..... 23
- Tabela 3.** Dados histoquímicos para secreção do Vaso deferente médio (VDM), espinho, acrossoma e núcleo do espermatozoide de *L. schmitti*. +++ = fortemente positivo; ++ = positivo; + = fracamente positivo; - = negativo..... 26

Capítulo II - Criopreservação da massa espermática e espermatóforo do camarão branco *Litopenaeus schmitti*

- Tabela 1.** Composição da solução salina. 44
- Tabela 2.** Protocolos utilizados para criopreservação da massa espermática e espermatóforo do camarão branco *L. schmitti*..... 46
- Tabela 3.** Valores médios e desvios padrões das curvas de criopreservação da massa espermática e do espermatóforo (SPTF) do *L. schmitti*..... 48
- Tabela 4.** Valores médios e desvios padrões da sobrevivência espermática das massas espermáticas e espermatóforos criopreservados por 30, 60 e 90 dias em Glicerol e DMSO (10%)..... 50

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
CAPÍTULO I - VIABILIDADE DO ESPERMATOZOIDE E INFLUÊNCIA DA VARIÇÃO SAZONAL NOS TÚBULOS SEMINÍFEROS DO CAMARÃO BRANCO <i>LITOPENAEUS SCHMITTI</i> (CRUSTACEA, DECAPODA, PENAEIDAE)	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1 Origem dos Animais para Microscopia Eletrônica.....	16
2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	16
2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	16
2.4 Origem dos animais para histologia.....	17
2.5 Fixação e Preparação dos cortes histológicos.....	17
2.6 Análise Histológica e Histoquímica.....	17
2.7 Observações e Fotomicrografias.....	17
2.8 Tratamentos experimentais.....	18
2.9 Análise estatística.....	18
3. RESULTADOS	19
3.1 Morfologia do Sistema Reprodutor masculino do camarão branco <i>L. schmitti</i>	19
3.2 Testículos.....	21
3.3 Vaso Deferente Proximal (VDP) e Médio (VDM).....	23
3.4 Vaso deferente distal (VDD) e Ampola terminal.....	23
3.5 Histoquímica do Vaso Deferente Médio e Espermatóforo.....	26
4. DISCUSSÃO	28
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
CAPÍTULO II - CRIOPRESERVAÇÃO DA MASSA ESPERMÁTICA E ESPERMATÓFORO DO CAMARÃO BRANCO <i>LITOPENAEUS SCHMITTI</i>	38
RESUMO	39
ABSTRACT	40
1. INTRODUÇÃO	41
2. MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1 Local e coleta dos animais.....	43
2.2 Tratamentos experimentais.....	43
2.3 Procedimentos experimentais.....	43
Primeira Etapa: Avaliação de duas Curvas para a definição de um Protocolo	45
Segunda Etapa: Criopreservação	46

2.4 Análise Estatística	47
3. RESULTADOS.....	48
3.1 Definição do protocolo para criopreservação.....	48
3.2 Avaliação dos crioprotetores e métodos (massa espermática e espermatóforo) para criopreservação.....	48
4. DISCUSSÃO.....	51
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	54
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

INTRODUÇÃO GERAL

Os camarões da subordem Dendrobranchiata são conhecidos por apresentarem várias espécies que constituem importantes recursos pesqueiros, sendo estes divididos em seis famílias: Penaeidae, Sicyoniidae, Solenoceridae, Aristeidae, Sergestidae e Luciferidae (D'INCAO, 1999). Dentre a Família Penaeidae, seis espécies são registradas na costa brasileira: *Litopenaeus schmitti*, *Farfantepenaeus brasiliensis*, *Farfantepenaeus notialis*, *Farfantepenaeus paulensis*, *Farfantepenaeus subtilis* e *Xiphopenaeus kroyeri*. Destas seis espécies nativas do nosso litoral, o camarão branco *L. schmitti* é o único representante do gênero *Litopenaeus* (BUENO, 1989).

O litoral do Rio de Janeiro é composto por várias baías e enseadas, destacando-se entre elas a Baía de Sepetiba, com aproximadamente 305 Km² de área e com um corpo de águas salinas e salobras, comunicando-se com o oceano Atlântico (SOARES, 1997). Nesta Baía, o *L. schmitti* representa 38% dos camarões capturados, e este, juntamente com o camarão rosa (*F. brasiliensis*) são considerados um dos principais recursos pesqueiros da região (OSHIRO, 2005). Das espécies de camarões que ocorrem neste local, somente *L. schmitti* realiza todo seu ciclo de vida dentro da baía (SILVA, 1977), ocorrendo sua desova pelo menos duas vezes ao ano.

O camarão *L. schmitti* é conhecido popularmente como camarão-branco, camarão-legítimo ou “vila franca” e ocorre no Atlântico Ocidental, das Antilhas ao Rio Grande do Sul. A pesca extrativa de *L. schmitti* no Rio de Janeiro é realizada utilizando a frota artesanal (INFOPECA, 2010). Os adultos desta espécie são encontrados em regiões marinhas de pequenas profundidades até 30 metros, com registros de ocorrência a 47 metros, no Estado do Rio de Janeiro (SILVA, 1977). A postura de *L. schmitti* aparentemente é realizada em águas marinhas de pequena profundidade e salinidade elevada (PEREZ-FARFANTE, 1969, 1970; COELHO e SANTOS, 1994). A duração do período reprodutivo foi objeto de alguns estudos anteriores, realizados em Cuba (PEREZ-FARFANTE, 1969, 1970), na Baía de Sepetiba (SILVA, 1965) e na Baía de Santos (NEIVA et al., 1971).

Na década de 90 foi realizado o cultivo comercial do camarão *Litopenaeus schmitti* na Bahia, porém devido aos resultados insatisfatórios, os cultivos fecharam e a partir daí poucos estudos foram realizados com esta finalidade. Atualmente, não existem produções comerciais desta espécie no Brasil, o que destaca a importância de investimento em novos estudos de tecnologias, que permitam explorar seu potencial produtivo ressaltando que o camarão *Litopenaeus schmitti* é considerado a quarta espécie de maior interesse econômico (BOCHINI, 2012). O camarão *L. schmitti* alcança um tamanho maior em relação às espécies nativas de peneídeos, sendo considerada uma das mais promissoras para a aquicultura no Brasil e em cultivos extensivos com salinidades entre 20 a 45, além da aceitação no mercado consumidor, portanto a continuidade dos estudos voltados para o conhecimento do seu ciclo biológico é importante.

O ciclo de vida completo dos camarões peneídeos apresenta uma duração aproximadamente de 24 meses, sendo que os imaturos e adultos não migram, necessariamente para o mar aberto (SILVA, 1977). A maior parte das fêmeas em postura tem sete meses de idade, sendo a idade média da primeira maturação, inferior a 6 meses; poucas se reproduzem novamente (COELHO e SANTOS, 1994). Na Baía de Sepetiba ocorre uma particularidade, o camarão branco desova na própria Baía, e não em mar aberto e as pós-larvas migram para a região estuarina adjacente. As fêmeas adultas ocorrem nas proximidades da Restinga da Marambaia, onde desovam (SILVA, 1977).

As estruturas reprodutivas externas em camarões da família Penaeidae, que representam os caracteres sexuais secundários são o petasma nos machos e o tético (área especializada na recepção do espermátóforo no momento da cópula) nas fêmeas. O petasma localiza-se na base do primeiro par de pleópodos e auxilia a transferência do espermátóforo (estrutura de armazenamento de espermatozoides), para o tético da fêmea.

O dimorfismo sexual nos camarões desta família difere entre os gêneros segundo as características do tético, podendo ser simples e aberto ou mais elaborado e fechado (DALL, 1990). O tético localiza-se junto à base do quinto par de pereiópodos (BUENO, 1989). As espécies do gênero *Litopenaeus* apresentam o tético aberto (simples e aberto), como por exemplo, *L. schmitti*, *L. vannamei*, *L. stylirostris* e *L. setiferus*. Neste gênero, a cópula ocorre somente no período de intermuda devido à necessidade da carapaça estar enrijecida, para manter o espermátóforo aderido ao tético. As fêmeas destas espécies utilizam o espermátóforo uma única vez. É comum ocorrer a perda do espermátóforo, sem que haja a fecundação dos ovócitos e para evitar que este fato aconteça, a cópula ocorre algumas horas antes da ovulação (BRAY et al., 1982). Os demais gêneros das espécies de peneídeos que apresentam o tético fechado são representados por: *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798), *F. subtilis* (Pérez-Farfante 1967), *F. brasiliensis* (Latreille 1817), *F. paulensis* (Pérez-Farfante 1967), *Trachypenaeus byrdi* (Burkenroad 1934), *Xiphopenaeus riveti* (Bouvier 1907) e *X. kroyeri* (Heller 1862) (DALL et al., 1990). Nestas espécies, a cópula ocorre com machos que estão em intermuda e fêmeas recém mudadas, com a carapaça mole, que permite inserir o espermátóforo no tético através do receptáculo seminal (DALL et al., 1990).

Os problemas relacionados à reprodução de peneídeos são atribuídos na maioria das vezes às fêmeas. E quando estas em estado selvagem são comparadas às cultivadas em cativeiro, as selvagens apresentam desempenho reprodutivo melhor, em termos de taxa de fertilização, desova e número de náuplios para *P. monodon* (MENASVETA et al., 1993); *L. schmitti* (RAMOS et al., 1995); *L. stylirostris* (MENDOZA, 1997). Em *F. paulensis* estudou-se a comparação entre fêmeas selvagens e mantidas em cativeiro (CAVALLI et al., 1997), a maturação ovariana em fêmeas selvagens em relação as alterações histológicas e visuais (PEIXOTO et al., 2003), a influencia da inseminação artificial verificando o desempenho reprodutivo em sistemas convencional e unisex de maturação sexual; (PEIXOTO et al., 2004a), o efeito do tamanho e da idade sobre o desempenho reprodutivo das fêmeas cultivadas (PEIXOTO et al., 2004b) assim como do camarão branco *L. schmitti* avaliou-se os estágios do desenvolvimento gonadal, e comprimento médio na primeira maturação de fêmeas selvagens *L. schmitti* (MACHADO et al., 2009) e a maturação e desova de *L. vannamei* em condições sub-tropicais (KUMLU et al., 2011).

Em relação aos machos de *L. vannamei* foram observados que a quantidade e qualidade espermática dos animais cultivados em cativeiro com 12 meses de idade foi superior aos de seis meses (CEBALLOS-VAZQUEZ et al., 2003). Por outro lado, para a espécie *L. schmitti* com dois meses de cativeiro, os machos apresentaram a exaustão reprodutiva resultando em um declínio no desempenho reprodutivo, sendo esta observação mais acentuada para os camarões selvagens, provavelmente por serem menos tolerantes ao cativeiro (PÉREZ-JAR et al., 2007). Alfaro Montoya (2010) ao realizar uma revisão sobre a qualidade dos machos do gênero *Litopenaeus* relatou, que a adaptação ao cativeiro deste gênero ocorre de maneira diferente, sendo que o *L. vannamei* apresenta melhor adaptação, e este mesmo autor relata que são escassas as informações sobre os machos de *L. schmitti*, concordando com Perez-Jar et al. (2007).

O conhecimento da estrutura do sistema reprodutor masculino, bem como do espermatozoide são importantes para compreender como ocorre o ciclo biológico dos machos. Segundo Chow et al. (1991) a morfologia geral dos testículos de *L. setiferus* e *L. vannamei*

observada através da microscopia eletrônica pode ser diferente entre as subordens Decapoda, enquanto a estrutura funcional dos túbulos seminíferos são semelhantes.

Ro et al. (1990) estudaram o vaso deferente do *L. setiferus* dividindo-o em quatro regiões morfológicamente distintas, e Bauer e Cash (1991) dos camarões *L. setiferus*, *Farfantepenaeus duorarum* e *F. aztecus*.

Kleve et al. (1980) estudaram o espermatozoide maduro de *Sicyonia ingentis* por meio de técnicas citoquímicas e ultraestruturais para a compreensão do mecanismo de ativação e interação do gameta desta espécie e Braga et al. (2013) observaram as características do espermatozoide do camarão rosa *F. paulensis*, esses autores observaram no corpo do espermatozoide, uma faixa citoplasmática perinuclear, o núcleo, o capuz acrossomal e uma região subacrossomal.

Os espermatozoides são produzidos através da espermatogênese de modo semelhante ao que ocorre em vertebrados. A espermatogênese do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* foi observada através da histologia, histoquímica e microscopia eletrônica por Poljaroen et al. (2010).

Estudos comparativos da espermiogênese e a estrutura do espermatozoide do camarão *Parapenaeus longirostris* com os demais crustáceos decápodos foram realizados por Medina (1994).

Diversos estudos foram realizados sobre o sistema reprodutor masculino como visto acima, porém até o presente momento, não foi observado nenhum estudo neste contexto com a espécie *L. schmitti*.

A criopreservação é uma técnica que pode ser utilizada tanto para a aquicultura (manutenção dos gametas femininos ou masculinos em nitrogênio líquido para reprodução em cativeiro e melhoramento genético) como para preservação das espécies. Poucas pesquisas foram realizadas na área da criopreservação de sêmen de invertebrados aquáticos (GWO, 2000). As primeiras foram direcionadas para a criopreservação de espermatozoide de ostras *Crassostrea virginica* (ZELL et al., 1979). Posteriormente, para os crustáceos foram realizados estudos sobre a criopreservação dos espermatóforos do camarão de água doce *M. rosenbergii* (CHOW et al., 1985; AKARASANON, et al., 2004), do caranguejo *S. serrata* (JEYALECTUMIE e SUBRAMONIAM, 1989), do camarão marinho *L. vannamei* (BRAY e LAWRENCE, 1998; NIMRAT et al., 2006) e *P. monodon* (NIMRAT et al., 2005; BART et al., 2006; VUTHIPHANDCHAI et al., 2007); e também da massa espermática de *L. vannamei* (LEZCANO et al., 2004; SALAZAR et al., 2008), do embrião do camarão *P. monodon* (VUTHIPHANDCHAI et al., 2005), e somente um trabalho com a massa espermática de *L. schmitti* (CASTELO BRANCO, 2010).

A criopreservação dos gametas do camarão branco *Litopenaeus schmitti* permitirá a manutenção dos estoques na Baía de Sepetiba, reduzindo os impactos negativos da pesca extrativista, resultando em uma produção sustentável.

Este trabalho foi dividido em dois capítulos contendo os seguintes objetivos:

- **Capítulo I:** Viabilidade do espermatozoide e influência da variação sazonal nos túbulos seminíferos do camarão branco *Litopenaeus schmitti* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Este capítulo teve como objetivo caracterizar o sistema reprodutor de machos comerciais desta espécie, através de estudos histológicos e microscopia eletrônica.
- **Capítulo II:** Criopreservação da massa espermática e espermatóforo do camarão branco *Litopenaeus schmitti*, que foi subdividido em dois ensaios. O primeiro avaliou a viabilidade de dois protocolos de congelamento da massa espermática e do espermatóforo. O segundo avaliou a eficiência de dois crioprotetores na

criopreservação tanto da massa espermática, quanto do espermátóforo utilizando o melhor protocolo do primeiro ensaio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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-MONTOYA, J.; HERNÁNDEZ, L. The histological structure of the androgenic gland and cellular cord of the male reproductive system of adult *Litopenaeus* and *Rimapenaeus byrdi*. **Journal of Crustacean Biology**, v.32, n.3, p. 351-357, 2012.

BART, A.N.; CHOOSUK, S.; THAKUR, D.P. Spermatophore cryopreservation and artificial insemination of black tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). **Aquaculture Research**, v. 37, p. 523-528, 2006.

BAUER, R.T; CASH, C.E. Spermatophore structure and anatomy of the ejaculatory duct in *Penaeus setiferus*, *P. duorarum* and *P. aztecus* (Crustacea: Decapoda): homologies and functional significance. **Transactions of the American Microscopical Society**, 110, v.2, 144-162. 1991

BOCHINI, G.L. Distribuição ecológica e estrutura populacional em escala espacial, temporal e anual do camarão-branco *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936) (Dendrobranchiata: Penaeidae) na enseada de Ubatuba: 4 anos de estudos. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)**, Universidade Estadual Paulista de Botucatu. 2012. 85p.

BRAGA, A.L.; NAKAYAMA, CASTRO, C.L.; L.A.S.; WASIELESKY, W. Spermatozoa ultrastructure of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda: Dendrobranchiata). **Acta Zoologica (Stockholm)**, v.94, p. 119–124 (January 2013).

BRAY, W.A.; CHAMBERLAIN, G.W.; LAWRENCE, A.L. Increased larval production of *Penaeus setiferus* by artificial insemination during sourcing cruises. **Journal of the World Mariculture Society**, v.13, p.123-133, 1982.

BRAY, W.A.; LAWRENCE, A.L. Male viability determinations in *Penaeus vannamei*: evaluation of short-term storage of spermatophores up to 36 h and comparison of Ca-free saline and seawater as sperm homogenate media. **Aquaculture**, v.160, p. 63–67, 1998.

BUENO, S. L. S. Maturation and spawning of the white shrimp *Penaeus schmitti* Burkenroad, 1936, under large scale rearing conditions. **Journal of the World Aquaculture Society**, n.21, v.3, p.170-179, 1990.

BUENO, S.L.S. Fechamento do ciclo de vida do camarão branco *Penaeus schmitti* Burkenroad, 1936 (CRUSTACEA, DECAPODA, PENAEIDAE) sob condições de cultivo em escala comercial. **Tese (Doutorado em Zoologia)**. USP. 136p. 1989.

CAVALLI, R.O., SCARDUA, M.P., WASIELESKY, W. Reproductive performance of different-sized wild and pond-reared *Penaeus paulensis* females. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 28, n. 3, p.260–267, 1997.

CEBALLOS-VAZQUEZ, 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.

CASTELO-BRANCO, T.C. Avaliação de técnicas de criopreservação de sêmen do camarão branco, *Litopenaeus schmitti* (Crustacea, Dendrobranchiata, Penaeidae). **Dissertação (Mestrado em Ciências)**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2010. 42p.

CHOW, S.; DOUGHERTY, M.M.; DOUGHERTY, W.J.; SANDIFER, P.A. Spermatophore formation in the white shrimps *Penaeus setiferus* and *P. vannamei*. **Journal of Crustacean Biology**, v.11, n.2, p. 201-216, 1991.

CHOW, S.; TAKI, Y.; OGASAWARA, Y. Cryopreservation of spermatophore of the fresh water shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*. **The Biological Bulletin**, v.168, p. 471–5, 1985.

COELHO, P.A., SANTOS, M.C.F. Ciclo biológico de *Penaeus schmitti* Burkenroad, em Pernambuco (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). **Boletim Técnico-Científico do CEPENE, Tamandaré**, v. 2, p. 35- 50, 1994.

DALL, W.; HILL, B.J.; ROTH LISBERG, O.C.; STAPLES, D.J. 1990. The biology of the Penaeidae. In: BLAXTER, J.H. e SOUTHWARD A.J. (eds.). **Advances in Marine Biology**. Academic Press, UK, volume 27, 489p.

DESANTIS, S.; LABATE, M.; LABATE, G.M.; MAIORANO, P.; TURSI, A. An ultrastructural and histochemical study of the germinal cells contained in hemispermatozoa of males of the *Aristaeomorpha foliacea* (Risso, 1827). **Hydrobiologia**, v. 557, p.41-49, 2006.

D'INCAO, F. 1999. Subordem Dendrobranchiata (camarões marinhos), p. 271-299. In: Backup, L. & Bond-Backup, G. (Ed.) **Os Crustáceos do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, Editora da Universidade, 514 p.

INFOPECA O mercado de pescado da região metropolitana do Rio de Janeiro. 103p. 2010.

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

KLEVE, M.; YUDIN, A.I.; CLARK, W.H.JR. Fine structure of the unistellate sperm of the shrimp, *Sicyonia ingentis* (Natantia). **Tissue e Cell**, v. 12, n. 1, p. 29-45, 1980.

KUMLU, M.; TÜRKMEN, S., KUMLU, M.; EROLDÖĞAN, O.T. Off-season Maturation and Spawning of the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* in Sub-tropical Conditions. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.11, p.15-23, 2011.

LEZCANO, M; GRANJA, C.; SALAZAR, M. The use of flowcytometry in the evaluation of cell viability of cryopreserved sperm of the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Cryobiology**, v. 48, p. 349–56, 2004.

MACHADO, I.F.; CESTARI DUMONT, L.F.C.; D'INCAO, F. Stages of gonadal development and mean length at first maturity of wild females of white shrimp (*Litopenaeus schmitti* – Decapoda, Penaeidae) in Southern Brazil. **Atlântica**, Rio Grande, v. 31, n.2, p. 169-175, 2009.

MEDINA, A. Spermiogenesis and sperm structure in the shrimp *Parapenaeus longirostris* (Crustacea: Dendrobranchiata): comparative aspects among decapods. **Marine Biology**, v. 119, p. 449-460, 1994.

MENASVETA, P.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; RUNGSUPA, S.; MOREE, N.; FAST, A.W. Gonadal maturation and reproductive performance of giant tiger prawn (*Penaeus monodon* Fabricius) from the Andaman Sea and pond-reared sources in Thailand. **Aquaculture**, v.116, p. 191– 198, 1993.

MENDOZA, R. Nauplii production from wild, cultivated, and mixed populations of blue shrimp, *Penaeus stylirostris*. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 7, p. 41– 50, 1997.

NASCIMENTO, I.A.; BRAY, W.A.; LEUNG TRUJILLO, J.R.; LAWRENCE, A. Reproduction of ablated an unablated *Penaeus schmitti* in captivity using diets consisting of fresh-frozen natural and dried formulated feeds. **Aquaculture**, v.99, p. 387-398,1991.

NEIVA, G.S.; WORSMANANN, T.U.; OLIVEIRA, M.T.;VALEN-TINI, H. Contribuição ao estudo da maturação da gônada feminina do camarão-rosa (*Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967). **Boletim do Instituto de Pesca**, n.4, p.23-38, 1971.

NIMRAT, S.; SANGNAWAKIJ, T.; VUTHIPHANDCHAI, V. Preservation of Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* Spermatophores by Chilled Storage. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 36, n. 1, p. 76-86 2005.

NIMRAT, S.; SIRIBOONLAMOM, S.; ZHANG, S.; XU, Y.; VUTHIPHANDCHAI, V. Chilled storage of white shrimp (*L. vannamei*) spermatophores. **Aquaculture**, n.261, p.944–951, 2006.

OSHIRO, L.M.Y. Relatório Técnico apresentado à APLIM. **Estudo das populações de camarões e siris da Baía de Sepetiba/RJ**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ. 26 pp. 2005.

PEIXOTO, S.; CAVALLI, R.O.; D'INCAO, F; MILACH, A.M.; WASIELESKY, W. Ovarian maturation of wild *Farfantepenaeus paulensis* in relation to histological and visual changes. **Aquaculture Research**, v.34, p. 1255-1260, 2003.

PEIXOTO, S., CAVALLI, R.O., KRUMMENAUER, D., WASIELESKY, W., D'INCAO, F. Influence of artificial insemination on the reproductive performance of *Farfantepenaeus paulensis* in conventional and unisex maturation systems. **Aquaculture**, v.230, p.197–204, 2004a.

- 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, 2004b.
- PÉREZ-FARFANTE, I. Sinopsis de datos biológicos sobre el camarón blanco *Penaeus schmitti* Burkenroad, 1936. **FAO Fishery Reports**, v. 4, n. 37, p.1417-1438, 1970.
- PÉREZ-FARFANTE, I. Western Atlantic shrimps of the genus *Penaeus*. **Fishery Bulletin**, v. 67, p.461-591, 1969.
- PÉREZ-JAR, L.; RAMOS, L.; PALACIOS, E.; RACOTTA, I.S. Reproductive performance and sperm quality in wild and pond-reared southern white shrimp *Litopenaeus schmitti* adult males during continuous reproductive activity. **Revista de Investigaciones Marinas**, v. 28, n.3, p. 237-246, 2007.
- 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 wildcaught *Penaeus monodon* in Thailand. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 24, p. 530– 540, 1993.
- RAMOS, L.; ESPEJO, M.; SAMADA, S.; PE´REZ, L. Maturation and reproduction of pond-reared *Penaeus schmitti*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 26, p. 183– 187, 1995.
- RO, S.; TALBOT, P.; LEUNG-TRUJILLO, J.; LAWRENCE, A.L. Structure and function of the vas deferens: Segments 1-3. **Journal of Crustacean Biology**, v. 10, n.3, p. 455-468, 1990.
- SALAZAR, M.; LEZCANO, M.; GRANJA, C. 2008. Protocol for cryopreservation of *Penaeus vannamei* sperm cells. In: CABRITA, E.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, P. Methods in Reproductive Aquaculture. **Marine and Freshwater Species**. Boca raton, FL, CRC Press, p.505-508.
- SILVA, O. **Alguns peneídeos e palinurídeos do Atlântico Sul**. Rio de Janeiro: SUDEPE, 1965.
- SILVA, O. Aspectos bioecológicos e pesqueiros de três espécies de camarões do gênero *Penaeus* nas Costas do Estado do Rio de Janeiro e experimentos de cultivo. **Dissertação (Mestrado em Zoologia)**. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 1977. 74p.
- SOARES, M.L.G. Estudo da biomassa aérea de manguezais do sudeste do Brasil. Análise de modelos. **Tese (Doutorado em Oceanografia)**. Universidade de São Paulo. 2 vol. 1997.
- VUTHIPHANDCHAI, V.; NIMRAT, S.; KOTCHARAT S.; BART, 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.

VUTHIPHANDCHAI, V.; PENGUN, B.; NIMRAT, S. Effects of cryoprotectant toxicity and temperature sensitivity on the embryos of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture**, v.246, p. 275– 284, 2005.

ZELL, R.; BAMFORD, M.H.; HIDU, H. Cryopreservation of spermatozoa of the American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. **Cryobiology**, n.16, v.5, p.448-460, 1979.

CAPÍTULO I

VIABILIDADE DO ESPERMATOZOIDE E INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO SAZONAL NOS TÚBULOS SEMINÍFEROS DO CAMARÃO BRANCO *LITOPENAEUS SCHMITTI* (CRUSTACEA, DECAPODA, PENAEIDAE)

RESUMO

Este estudo avaliou a espermatogênese nos testículos, a variação sazonal sobre os túbulos seminíferos, comparou a morfologia dos espermatozoides de animais frescos e *post mortem* presentes nos vasos deferentes proximal (VDP), médio (VDM) e ampola terminal dos camarões machos *Litopenaeus schmitti* oriundos da pesca artesanal, na Baía de Sepetiba (Saco da Pombeba). Para este trabalho, 21 machos adultos foram comprados em cada estação (primavera, verão, outono e inverno, totalizando 84 animais), de pescadores no momento do desembarque para as peixarias (animais *post mortem* aproximadamente a 48h), e três animais vivos (denominados “frescos”) para cada estação do ano (totalizando 12 animais). Os animais foram conduzidos ao laboratório da Estação de Biologia Marinha de Itacuruçá, Mangaratiba - RJ, para o processamento histológico. A área do testículo aumentou entre a primavera e o verão demonstrando que há a influência da estação no mesmo, entretanto, não houve diferença estatística para o tamanho das células espermáticas nas estações verão e inverno. A espermatogênese e espermiogênese apresentaram desenvolvimento normal. Os espermatozoides da região do VDP nos animais *post mortem* apresentaram aglutinados e com deformações devido a pouca quantidade de secreção contida nesta região. No VDM os espermatozoides dos camarões *post mortem* apresentaram características semelhantes e sem alterações quando comparados aos dos camarões frescos, esta região por apresentar muita secreção protegeu os espermatozoides. A ampola terminal, região de muita complexidade e presença de glândulas secretoras também foi capaz de proteger as células espermáticas nos animais *post mortem*. O VDM possui secreção eosinófila e positiva para polissacarídeos neutros e ácidos que auxiliam na formação do espermatóforo. Tanto a secreção do VDM quanto os espermatozoides contidos na ampola terminal indicaram forte presença de proteína. Pode-se inferir que a partir das comparações das secreções no vaso deferente médio e ampola terminal em animais frescos e *post mortem* que é possível a utilização destes animais para a reprodução, uma vez que os espermatozoides observados apresentaram-se morfologicamente normais. Desta maneira a secreção da VDM exerce um fator protetivo para os espermatozoides mesmo em animais *post mortem*.

Palavras-chave: Penaeideo, histoquímica, sistema reprodutivo masculino, sazonalidade.

ABSTRACT

This study evaluated the spermatogenesis in the testicles, the seasonal variation of the seminiferous tubules, compared the spermatozoa morphology of the fresh animals and *post mortem* present in the proximal vas deferens (PVD), medium (MVD) and terminal ampoule of the males shrimp *Litopenaeus schmitti* in the Sepetiba Bay ("Saco da Pombeba). For this study, 21 adult males were purchased in each season (spring, summer, autumn and winter, totaling 84 animals), fishing on the landing to the fishmongers (approximately 48h *post mortem* animals), and three live animals (called "Fresh") for each season (total 12 animals). The animals were taken to the laboratory of Marine Biology Station of Itacuruçá, Mangaratiba - RJ for histological processing. The area of the testicles increased between spring and summer showing that they suffer season influence, however, there was no statistical difference in the size of the sperm cells in the summer and winter seasons. Spermatogenesis and spermiogenesis showed normal development. The sperm of the region of PVD in animals *post mortem* showed agglutinated and deformations due to the small amount of secretion contained in this region. In MVD the sperm of shrimp *post mortem* showed similar and unchanged characteristics when compared to the fresh prawns, this region by presenting great secretion protected the spermatozoa. The terminal ampoule region of great complexity and presence of secretory glands was also able to protect the sperm cells in the *post mortem* animals. The MVD has eosinophilic secretion and positive to neutral and acid polysaccharides that aid in the formation of the spermatophore. Not only the secretion of MVD but also the spermatozoa contained in the terminal ampoule indicated great presence of protein. It can be inferred that from the secretions comparisons of the vas deferens medium and fresh terminal ampoule animal and *post mortem* it is possible to use these animals for breeding, once the observed sperm was presented itself morphologically normal. Thus the secretion of MVD exerts a protective factor over the spermatozoa even in animals *post mortem*.

Key words: Penaeideo, histochemistry, male reproductive system, seasonality.

1 INTRODUÇÃO

O sistema reprodutor dos camarões machos é constituído por testículos, vasos deferentes e ampolas terminais onde são formados os espermatóforos. Os camarões machos do gênero *Litopenaeus* apresentam como estratégia reprodutiva espermatóforos com grande complexidade para a proteção dos espermatozoides. Tanto os testículos quanto o vaso deferente se posicionam na região posterior da cavidade do cefalotórax, com exceção da porção terminal de cada vaso deferente. O testículo é composto por 7- 8 pares de lóbulos e se localiza na posição central do cefalotórax, entre o coração e o estômago, formando uma rede testicular simetricamente em ambos os lados com formato de “ferradura” (DALL, 1990) (Figura 1). Segundo King (1948) o testículo é envolto por duas camadas finas ou córtex, sendo a camada externa o epitélio, e a interna o tecido conjuntivo, não havendo tecido muscular.

Uma vez que o camarão atinge a maturidade sexual, a produção espermática ocorre continuamente sem interrupção (KING, 1948). A espermatogênese tem início na camada germinativa periférica dos túbulos testiculares, quando as espermatogônias entram na prófase da meiose. Os espermatozoides dos peneídeos não tem flagelo nem motilidade sendo divididos em três regiões anatomicamente distintas: corpo principal (região posterior), região intermediária e o espinho (região anterior) (KLEVE et al., 1980). O núcleo é quase periférico e com uma camada fina de citoplasma, formando o corpo principal da célula. Este apresenta formato cônico, com uma região limite entre o espinho e o núcleo contendo o acrossoma. A ligação entre o espermatozoide e o óvulo ocorre por meio do espinho, sendo que o acrossoma se modifica permitindo a ocorrência da fertilização (DALL, 1990).

Segundo Shigekawa e Clark (1986), o processo da espermatogênese em *Sicyonia ingentis* tem início com a proliferação das espermatogônias, as quais entram em processo de divisão mitótica contínua a partir da primeira maturidade e durante toda a vida do macho. As espermatogônias apresentam um rápido crescimento e são denominados espermatócitos. As divisões meióticas dos espermatócitos ocorrem no testículo e produzem as espermátides; estas vão sofrer o processo de diferenciação denominado de espermiogênese, transformando-se em espermatozoides (SHIGEKAWA e CLARK, 1986), que serão então conduzidos ao vaso deferente.

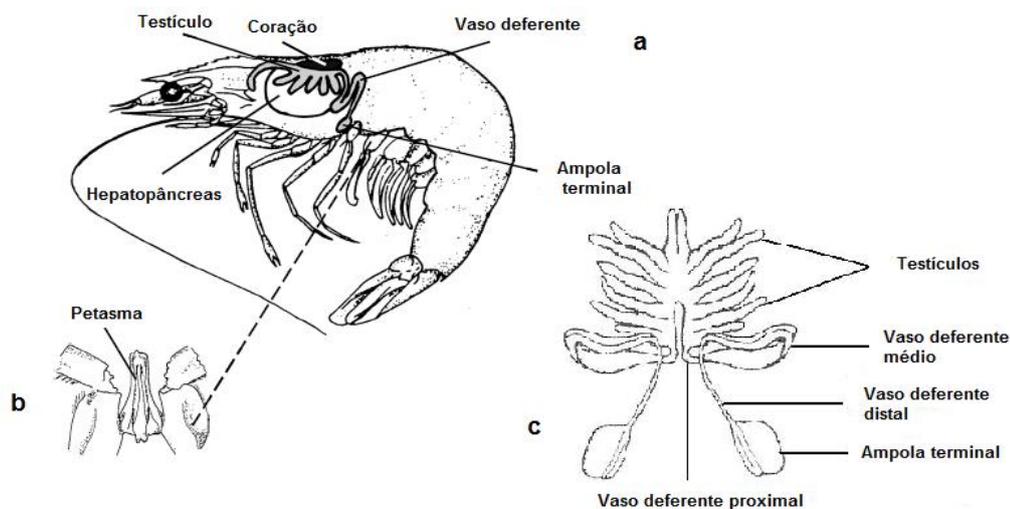


Figura 1. Sistema Reprodutor Masculino de camarões penéideos. a) Localização anatômica. b) Petasma. c) Vista dorsal do sistema reprodutor isolado (modificado de Alfaro, 2001 e King, 1948).

O vaso deferente é dividido em três regiões: proximal (VDP), médio (VDM, parte ampliada do ducto deferente) e distal (VDD). A parte proximal não se caracteriza por ser apenas uma região receptora de espermatozoides oriundos dos testículos, que ainda estão dispersos em virtude da ausência de secreção nos túbulos coletores, mas também é uma região secretora. No PDV evidencia-se o início da produção de secreções que irão unir os espermatozoides, formando uma massa. O VDM é forrado por um epitélio secretor e dividido internamente em dois ductos por um septo. Nestes ductos, ocorre a formação da ala (estrutura que auxilia a fixação do espermatóforo no téllico da fêmea), bem como de outras estruturas que se unirão a massa de espermatozoides nas primeiras camadas e darão forma ao espermatóforo. No VDD, a separação dos dois ductos é incompleta, porém apresenta um septo parcial que se estende até a ampola terminal onde o espermatóforo é compactado e a camada hialina é secretada em torno da matriz espermática (MALEK e BAWEB, 1974). De acordo com RO et al. (1990), este mesmo padrão de formação dos espermatóforos ocorre para camarões de téllico aberto.

Os espermatozoides dos camarões do gênero *Litopenaeus* são empacotados em espermatóforos complexos compostos por uma variedade de substâncias secretadas no sistema reprodutor masculino (BAUER e CASH, 1991; CHOW et al., 1991).

O desenvolvimento gonadal de fêmeas de penéideos pode ser observado macroscopicamente e microscopicamente (MEDINA et al., 1996; KAO et al., 1999; PEIXOTO et al., 2002; PEIXOTO et al., 2003; PEIXOTO et al., 2005; CAMPOS et al., 2009; MACHADO et al., 2009), entre outros. Para os machos a determinação da maturação sexual é possível através da observação do peso dos animais, o grau de união do petasma, e a presença do espermatóforo na ampola terminal e, microscopicamente, pode ser verificada a presença de espermatozoides maduros no vaso deferente e espermatóforo por meio de análise histológica ou observação da viabilidade espermática.

Desta forma, os objetivos deste trabalho foram:

1. Caracterizar os túbulos seminíferos de camarões brancos *L. schmitti post mortem*, comparando-os em diferentes estações do ano, por meio de técnica histológica;

2. Analisar a morfologia e a viabilidade dos espermatozoides de animais *post mortem* e a fresco, nas diferentes regiões do sistema reprodutor masculino, por meio da ultraestrutura e histoquímica;
3. Analisar a importância da secreção no vaso deferente e ampola terminal na preservação da morfologia do espermatozoide de machos *post mortem*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os camarões avaliados neste estudo apresentaram peso, comprimento total e comprimento da carapaça médios de $32,70 \pm 1,47$ g, $15,27 \pm 0,22$ cm e $3,32 \pm 0,08$ cm, respectivamente.

2.1 Origem dos Animais para Microscopia Eletrônica

Cinco machos comerciais de *L. schmitti* foram obtidos dos pescadores no momento do desembarque das pescarias (camarões *post mortem*, aproximadamente 48h). Destes foram retirados 10 espermatóforos e seus sistemas reprodutivos que foram individualizados em microtubos com capacidade para 1 mL e 60 mL respectivamente, ambos contendo glutaraldeído 2,5% + tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7,2, identificados e mantidos em refrigeração a 4°C por 2 dias. Posteriormente, os espermatóforos e os sistemas reprodutivos foram levados para o setor de entomologia médica e forense do IOC, FIOCRUZ, no departamento de microscopia para a realização das microscopias de varredura e de transmissão.

2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7,2, foram lavadas três vezes no tampão durante 10 minutos cada e pós fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, por 1 hora a temperatura ambiente e no escuro. Após essa lavagem, o material foi desidratado em séries crescentes de acetona (7,5, 15, 30, 50, 70, 90 e 100%), durante 5 minutos cada e submetidos ao método de secagem pelo ponto crítico com CO₂ superseco, em aparelho Balzers. Posteriormente, as amostras foram montadas em suportes metálicos utilizando fita dupla face e recobertas com ouro, no sputtering Balzers CPD030. A observação das amostras foi realizada ao microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6390LV (Akishima, Tokyo, Japan), da Plataforma de Microscopia Eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz, a 15 Kv. As imagens obtidas foram capturadas diretamente no computador utilizando o programa SemAfore.

2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a microscopia eletrônica de transmissão, as massas espermáticas extraídas dos espermatóforos foram fixadas em solução contendo glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e cloreto de cálcio 0,5% mM em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 (KARNOVSKY, 1965). A seguir foram lavadas sob centrifugação a 2500 rpm, por 2 vezes durante 5 minutos em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e 0,5 mM de Cloreto de cálcio em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, por 1 hora à temperatura ambiente, no escuro. As amostras foram desidratadas sob centrifugação a 2500 rpm, em gradientes crescentes de acetona a 50, 70 e 90%, durante 5 minutos cada e a 100%, 2 vezes por 10 minutos. Posteriormente, o material foi infiltrado em Epon seguido de inclusão definitiva em formas plásticas, para polimerização em estufa a 60°C, por 60 horas. Dos blocos obtidos por este processo foram confeccionados cortes ultrafinos (50-80 nm de espessura), recolhidos em grades de cobre e contrastados com acetato de uranila a 5% em água, por 15 minutos e a seguir em citrato de chumbo a 2% durante 2

minutos, para a observação ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol da Plataforma de Microscopia Eletrônica do IOC, FIOCRUZ.

2.4 Origem dos Animais para histologia

Foram adquiridos 21 machos adultos comerciais de *L. schmitti* oriundos da pesca (animais *post mortem* aproximadamente 48h) na Baía de Sepetiba (Saco da Pombeba), latitude 23° 3'13.91"S e longitude 43°54'44.93"O, em cada estação do ano: Agosto (inverno) e Novembro (primavera) de 2011 e Fevereiro (verão) e Maio (outono) de 2012 (totalizando 84 animais). E três animais vivos (camarões frescos) foram capturados nos mesmos períodos (totalizando 12 animais) e mantidos em caixa de isopor contendo água do mar e aeração para serem conduzidos ao laboratório da Estação de Biologia Marinha de Itacuruçá - Mangaratiba RJ, onde foram mantidos por 12 horas em tanques de polietileno com água e aeração constante até a insensibilização térmica dos mesmos.

2.5 Fixação e Preparação dos cortes histológicos

No laboratório os animais do grupo controle foram anestesiados por choque térmico (5min a -10°C) para a retirada da região do cefalotórax que foi fixado em solução Davidson (330 mL de álcool etílico, 220 mL de formoldeído, 115 mL de ácido acético glacial e 335 mL de água destilada) por 24h, segundo o protocolo de Bell e Lightner (1988) modificado. Após este período, o sistema reprodutor foi dissecado e as estruturas (testículo, vaso deferente proximal, vaso deferente médio, vaso deferente distal e ampola terminal) foram acondicionados separadamente em recipientes contendo álcool 70%.

Para a realização dos preparados histológicos o material foi encaminhado para o Laboratório de Histologia da Área de Histologia e Embriologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Os animais fixados foram submetidos aos processamentos de rotina para histologia que incluíram: desidratação em uma série crescente de álcoois, diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina Histosec® histológica no processador histológico da marca Lipshaw Trimatic 2500. Após a inclusão das estruturas do sistema reprodutor e confecção dos blocos, os mesmos foram seccionados em 5µm de espessura em micrótomo da marca Spencer 820.

2.6 Análise Histológica e histoquímica

Os cortes histológicos foram devidamente recolhidos em lâminas, desparafinizados, hidratados e corados em Hematoxilina de Delafield e Eosina (HE) para descrição da espermatogênese.

As técnicas histoquímicas utilizadas para o vaso deferente médio (VDM) e a ampola terminal foram do Ácido Periódico de Schiff (PAS) e do Azul de alcian (AB) pH 2.5 para detecção de polissacarídeos neutros e ácidos, respectivamente (metodologia descrita por TOULOSA et al., 2003), além do Xylidine Ponceau (MELO & VIDAL, 1980) para proteínas totais. Após as colorações específicas todas as lâminas foram montadas com Entellan (Merck). Ressalta-se a escolha destas estruturas em virtude das mesmas apresentarem importância na preservação dos espermatozoides por apresentarem secreções.

2.7 Observações e Fotomicrografias

As lâminas foram observadas e fotomicrografias foram feitas com o uso de câmera digital Leica DFC 290 acoplada ao microscópio ótico Leica modelo DM 2000.

As medidas das células espermatogênicas foram realizadas com o software Leica® IM50, com calibração apropriada para a objetiva utilizada. Foi medido o maior diâmetro da célula (n=15) para as estações, verão e inverno, e a área dos túbulos seminíferos, sempre em corte transversal, na primavera, verão, outono e inverno (n=30 para cada estação do ano).

2.8 Tratamentos Experimentais

As células espermatogênicas foram distribuídas em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 15 repetições; sendo dois tratamentos para testar os influências das estações do ano (verão e inverno) com relação às medidas das células espermáticas, e quatro tratamentos (primavera, verão, outono e inverno) com 30 repetições para avaliar a área dos túbulos seminíferos.

2.9 Análise estatística

Para verificar a normalidade dos dados foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov, a nível de 5% de significância. Os resultados para a comparação das medidas das células no verão e inverno e para a área dos túbulos seminíferos na primavera, verão, outono e inverno foram obtidos através da análise de variância (ANOVA, $\alpha=0,05$), complementada pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$), utilizando-se o programa estatístico SAS, procedimento PROC GLM.

3 RESULTADOS

3.1 Morfologia do Sistema Reprodutor masculino do camarão branco *L. schmitti*

O sistema reprodutor masculino de *L. schmitti* é um órgão par disposto em ambos os lados do corpo (Figura 2A). Em cada lado, o sistema reprodutor é composto de um testículo lobular (T), um vaso deferente, divididos em região proximal (VDP), médio (VDM), distal (VDD) e a ampola terminal (AT) onde são armazenados os espermatozoides. Observou-se no vaso deferente médio dissecado, coloração branca leitosa.

Nos machos adultos o petasma (Pe) (Figuras 2B, 3A) é uma estrutura complexa formada pela união dos endopoditos modificados do primeiro par de pleópodos em machos de camarão peneídeos.

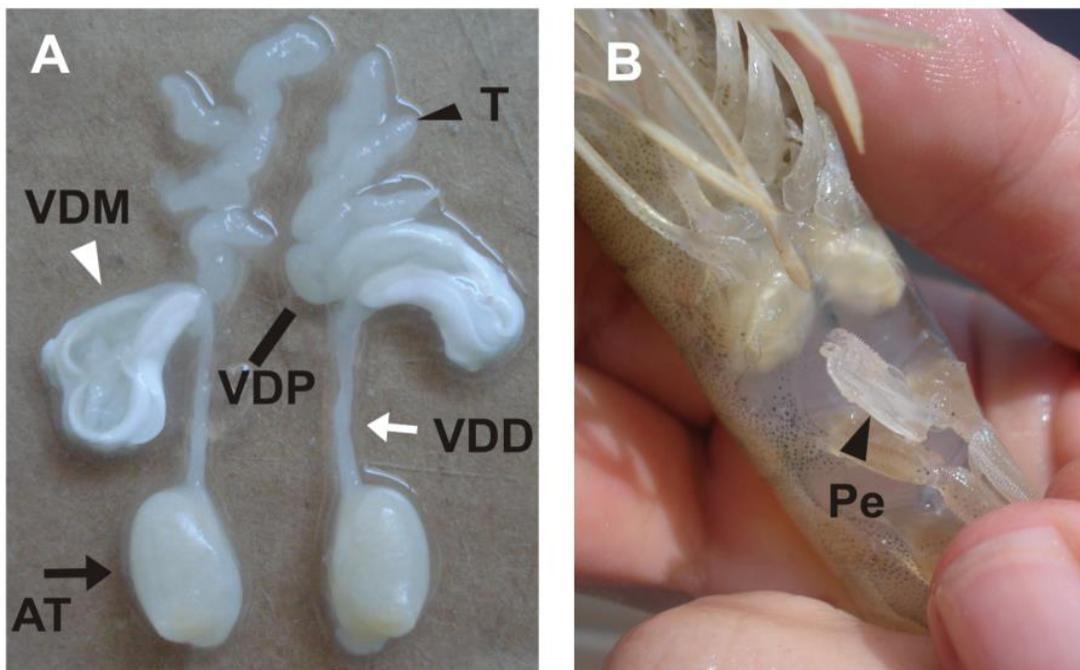


Figura 2. Morfologia externa do sistema reprodutor masculino do camarão branco *L. schmitti*.

Na região dorsal do petasma foram encontrados “ganchos” e/ou estruturas de fixação denominadas *cincinnuli* (Figuras 3A e B) e a região ventral aberta estreitando-se na extremidade anterior, sendo esta uma estrutura flexível (Figura 3E). A extremidade anterior contém várias projeções (Figuras 3C e D). A ampola terminal apresenta uma porção anterior por onde o espermatozoide é exteriorizado durante a cópula, e uma porção posterior por onde se conecta com o vaso deferente distal (ducto bastante estreito) (Figura 3F). Foi observado no corte transversal da ampola terminal, o saco espermático, a massa adesiva e o tiflossole (Figura 3G). Ao realizar o corte longitudinal da mesma, observou-se a ala, o tiflossole, o material adesivo, as glândulas e as paredes das glândulas secretoras (Figura 3H).

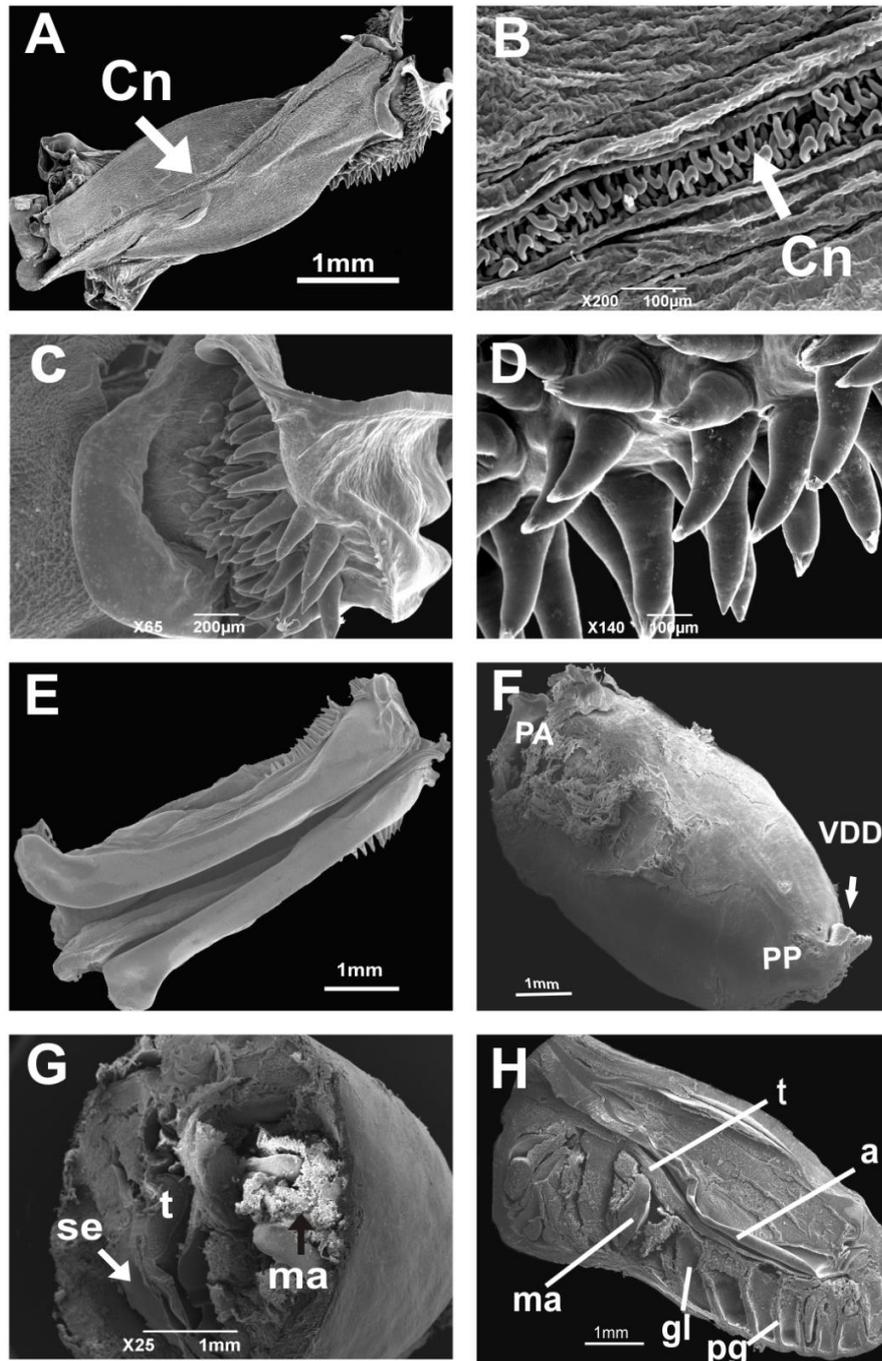


Figura 3. Ultraestrutura do petasma e da ampola terminal do camarão branco *Litopenaeus schmitti*. (A) Região dorsal do petasma; (B) *Cincinnuli*; (C) Região anterior do petasma; (D) Detalhe da região anterior do petasma (projeções); (E) Região ventral do petasma; (F) Ampola terminal e vaso deferente distal ; (G) Corte transversal da ampola terminal; (H) Corte longitudinal da ampola terminal. a = ala; AP = porção anterior; Cn = *cincinnuli*; gl = glândula secretora; ma = massa adesiva; VDD = vaso deferente distal; PA = porção anterior; pg = parede da glândula; PP = porção posterior; se = saco espermático; t = tiflossole.

3.2 Testículos

O testículo do camarão *L. schmitti* (Figura 2A) está localizado na região mediana do cefalotórax, entre o coração e o estômago, é uma estrutura multilobular de coloração branca com forma de dedos, apresentam lóbulos contendo cilindros compactados, que são os túbulos seminíferos enovelados (Figura 5B). Evidenciam-se nestes túbulos as células da linhagem germinativa, apresentando atividade espermatogênica apenas em algumas regiões, permanecendo o restante do epitélio composto por “espermatogônias em repouso”. Entremeadas às células germinativas, também foram encontradas células de sustentação (células de Sertoli) (Figura 4A). Estas células apresentaram núcleo grande, de formato irregular, com nucléolos evidentes, facilitando sua identificação entre as células espermatogênicas. A ampla luz tubular aparece sempre repleta de espermátides em fases avançadas da espermiogênese e/ou espermatozoides.

Verificou-se que houve diferença significativa ($P < 0,05$) na área dos túbulos seminíferos entre as estações do ano, destacando-se aquelas entre inverno e verão (16.962 e $26.169\mu\text{m}^2$, respectivamente); entretanto, na primavera e no outono não houve diferença significativa ($P > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão da área dos túbulos seminíferos de *L. schmitti* na primavera, verão, outono e inverno.

ESTAÇÕES DO ANO	N	ÁREA DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS (média \pm SD) (μm^2)
Verão	30	26.169 ± 5.608^A
Primavera	30	22.331 ± 5.157^B
Outono	30	20.329 ± 3.406^B
Inverno	30	16.962 ± 3.487^C

CV= 21,45

As médias com mesma letra não diferem entre si ($P < 0,001$).

No processo de divisão e diferenciação foram identificadas as seguintes células: espermatogônias, espermatócitos I e II, espermátides inicial, intermediária e final e espermatozoides (Figuras 4A-I). Nos pólos dos túbulos seminíferos analisados, pode-se verificar a presença de espermatogônias, que são responsáveis pela formação das demais células da linhagem espermatogênica (Figuras 4A, B e D).

Os espermatócitos I apresentaram núcleo com cromossomos em diferentes etapas da prófase meiótica e, independente da estação do ano observou-se uma vesícula próxima do mesmo, a qual não aparece nos espermatócitos II. A medida que a espermatogênese avança, as células vão reduzindo de tamanho (Figuras 4A e D). O espermatócito II e a espermátide inicial em detalhe encontram-se nas figuras 4E e F respectivamente, evidenciando bem a diferença entre o diâmetro celular e nuclear de ambas.

A espermiogênese pode ser caracterizada por três estágios: espermátide inicial, intermediária e final (Figuras 4D-H). A espermiogênese torna-se evidente durante as transformações das espermátides até a formação do espermatozoide. Há um alongamento da espermátide intermediária tomando a forma de um capuz e a presença do pró-acrossoma (Figura 4G), posteriormente este pró-acrossoma se alonga unindo-se ao núcleo (espermátide final, Figura 4H). A última diferenciação ocorre entre a espermátide final e o espermatozoide,

onde o pró-acrossoma alongado e unido toma a forma de espinho e o corpo principal já formado com o núcleo ocupando a maior parte do volume celular (Figura 4I). O espermatozoide é composto por um núcleo, rede filamentososa, acrosssoma em forma de capuz, uma fina camada de citoplasma e um espinho longo (uniestrelado) e eletrondenso, localizado na região anterior, que se estende da base localizada entre o acrosssoma e a região sub-acrossômica (Figura 4J).

As medidas referentes ao tamanho das espermatogônias, espermatócitos I e II, espermátides inicial, intermediária e final nas estações verão e inverno encontram-se na tabela 2, na qual observa-se que não houve diferença estatística entre as células espermatogênicas no inverno e verão.

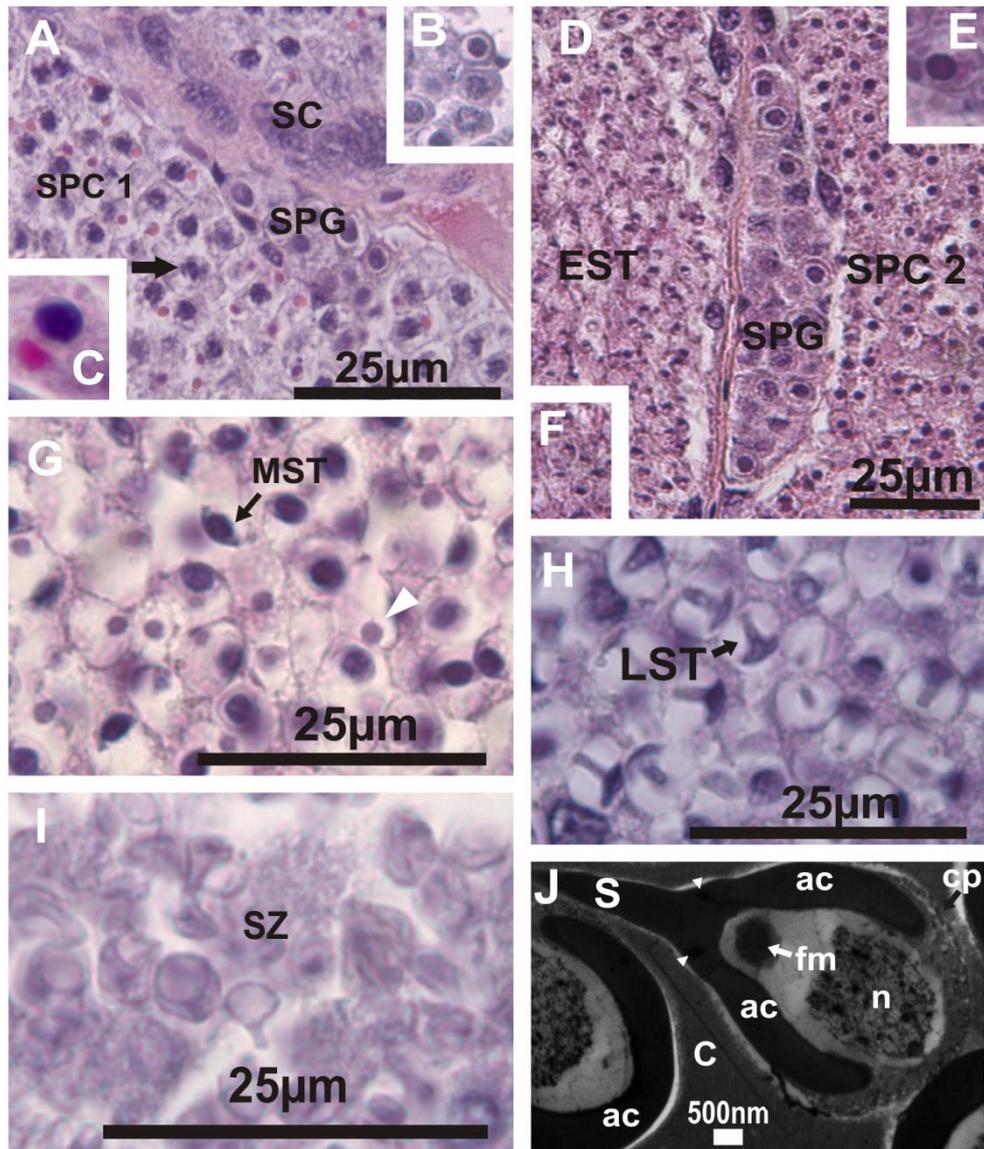


Figura 4. Espermatogênese de *L. schmitti*, corados com Hematoxilina-eosina (HE). (A) Células de Sertoli, espermatogônias e espermatócito I em divisão celular (seta); (B) Espermatogônia; (C) Detalhe do espermatócito I com vesícula próxima ao núcleo; (D) Espermatogônia, espermatócito II e espermátide inicial; (E) Espermatócito II com núcleo bem evidente e homogêneo; (F) espermátides inicial; (G); Espermátide intermediária com núcleo formando um cálice e a vesícula próacrossomal (cabeça de seta branca); (H) Espermátide final com corpo nuclear compacto no acrosssoma; (I) Espermatozoide; (J) Microscopia eletrônica de transmissão do espermatozoide, composto por espinho, acrosssoma, rede filamentososa, núcleo,

citoplasma, partícula citoplasmática, na base do espinho dois pontos proeminentes triangulares eletro densos (cabeça de seta branca). ac = acrossoma; C = citoplasma; cp = partícula citoplasmática; EST = espermátide inicial; fm = rede filamentosa; LST = espermátide final; MST = espermátide intermediária; n = núcleo; S = espinho; SC = células de Sertoli; SPC1 = espermátócito I; SPC2 = espermátócito II; SPG = espermatogônia; SZ = espermatozoide.

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão das células, espermatogônias, espermátócitos I e II, espermátides inicial, intermediária e final, no verão e inverno do camarão *L. schmitti*.

Tipo celular (μm)	Estações do ano		Coeficiente de variação (%)	p calculado
	Verão	Inverno		
Espermatogônia	8.53 \pm 1.06	7.88 \pm 0.62	10.70	0.0561
Espermátócito I	11.12 \pm 1.28	11.94 \pm 0.93	10.14	0.0709
Espermátócito II	6.64 \pm 0.82	7.48 \pm 1.32	16.24	0.0589
Espermátide inicial	3.76 \pm 0.56	3.77 \pm 0.53	14.63	0.9475
Espermátide intermediária	4.83 \pm 0.26	4.93 \pm 0.39	7.11	0.4507
Espermátide final	4.81 \pm 0.35	4.66 \pm 0.37	7.30	0.2582

3.3 Vaso Deferente proximal (VDP) e médio (VDM)

Observou-se pouca secreção no lúmen do VDP ocorrendo a presença de espermatozoides no mesmo (Figura 5C). Ao microscópio de luz, os espermatozoides recém produzidos se mantem dispersos nos animais frescos (Figura 6A) e, nos animais *post mortem*, os espermatozoides nesta mesma região estão bastante aglutinados com modificações morfológicas, como ausência de espinho e corpo danificado (formação de concavidade na região do núcleo) (Figuras 6B e C, respectivamente).

O VDM apresenta tiflossoles como canais, epitélio secretor e massa espermática envolvida por grande quantidade de secreção (Figura 5D). Nos animais frescos (Figura 6D) os espermatozoides apresentaram o espinho alongado e envolvidos por muita secreção; o mesmo foi observado nos animais *post mortem* (Figura 6E). Nesta região os espermatozoides se mantiveram íntegros na secreção e na matriz espermática (Figura 6F).

3.4 Vaso Deferente distal (VDD) e ampola terminal

Na Figura 5E, observa-se que o VDD é um tubo bastante estreito. A ampola terminal é uma região com estruturas complexas, apresentando tiflossole, ala, material adesivo, massa espermática e glândulas secretoras (Figura 5F). Os espermatozoides nesta região apresentaram o espinho bem alongado, o mesmo ocorreu tanto nos animais frescos (Figura 6G) como nos *post mortem* (Figuras 6H e I). O espermatozoide é composto por um corpo principal, a região acrossômica e o espinho de origem acrossomal (Figura 4G). No presente estudo foi observada a presença de um espermatozoide com o espinho dobrado (Figura 4H).

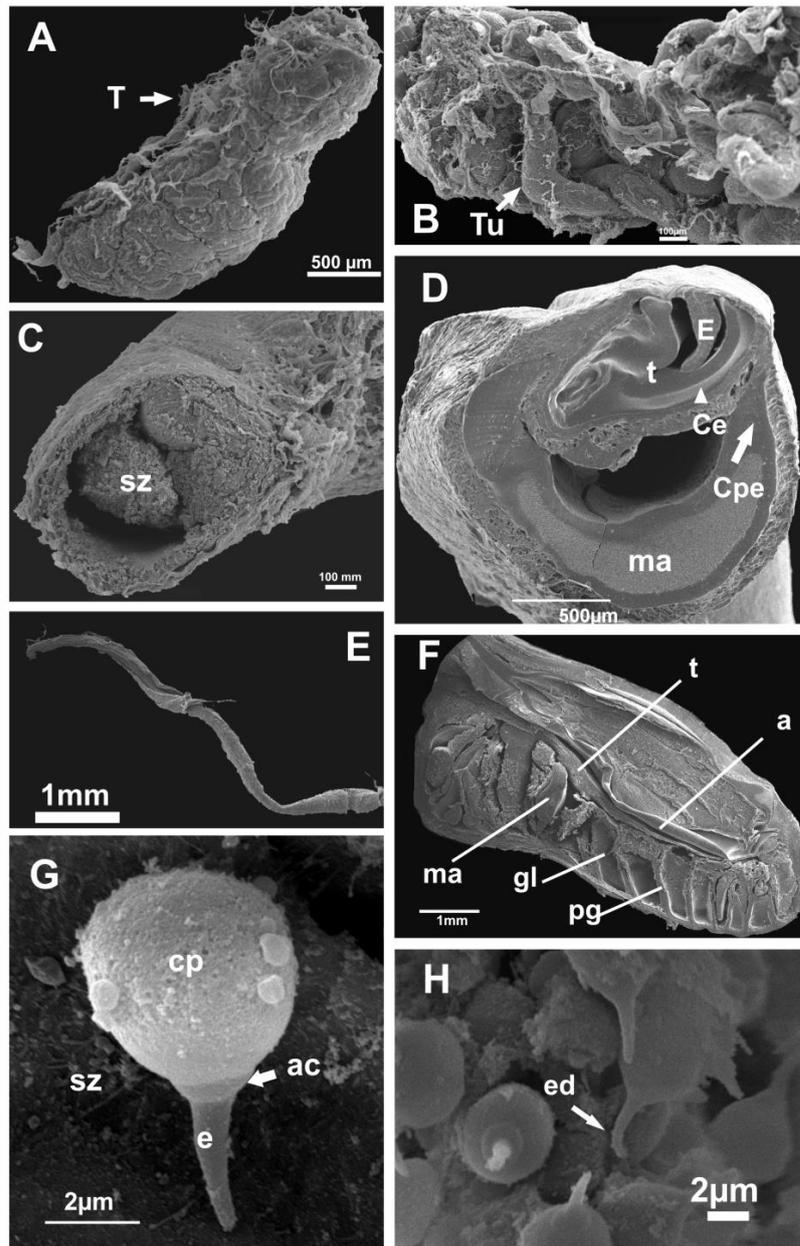


Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura do sistema reprodutor do *L. schmitti*. (A) e (B) testículo; (C) Corte transversal do vaso deferente proximal com espermatozoide no lúmen; (D) Corte transversal do vaso deferente médio contendo massa espermática e tiflossole; (E) Vaso deferente distal; (F) Corte longitudinal da ampola terminal contendo massa adesiva, tiflossole, ala, glândula de secreção e parede da glândula; (G) O espermatozoide é composto por um corpo principal, região acrossômica e espinho; (H) Espermatozoide com espinho dobrado. a= ala; ac = acrossoma; Ce = camada do epitélio; cp = corpo principal; Cpe = camada primária do espermatóforo; E = epitélio; e = espinho; ed = espinho dobrado; gl= glândula de secreção; ma = massa adesiva; pg = parede da glândula; SZ = espermatozoide; T = Testículo; t = tiflossole; Tu = túbulos seminíferos.

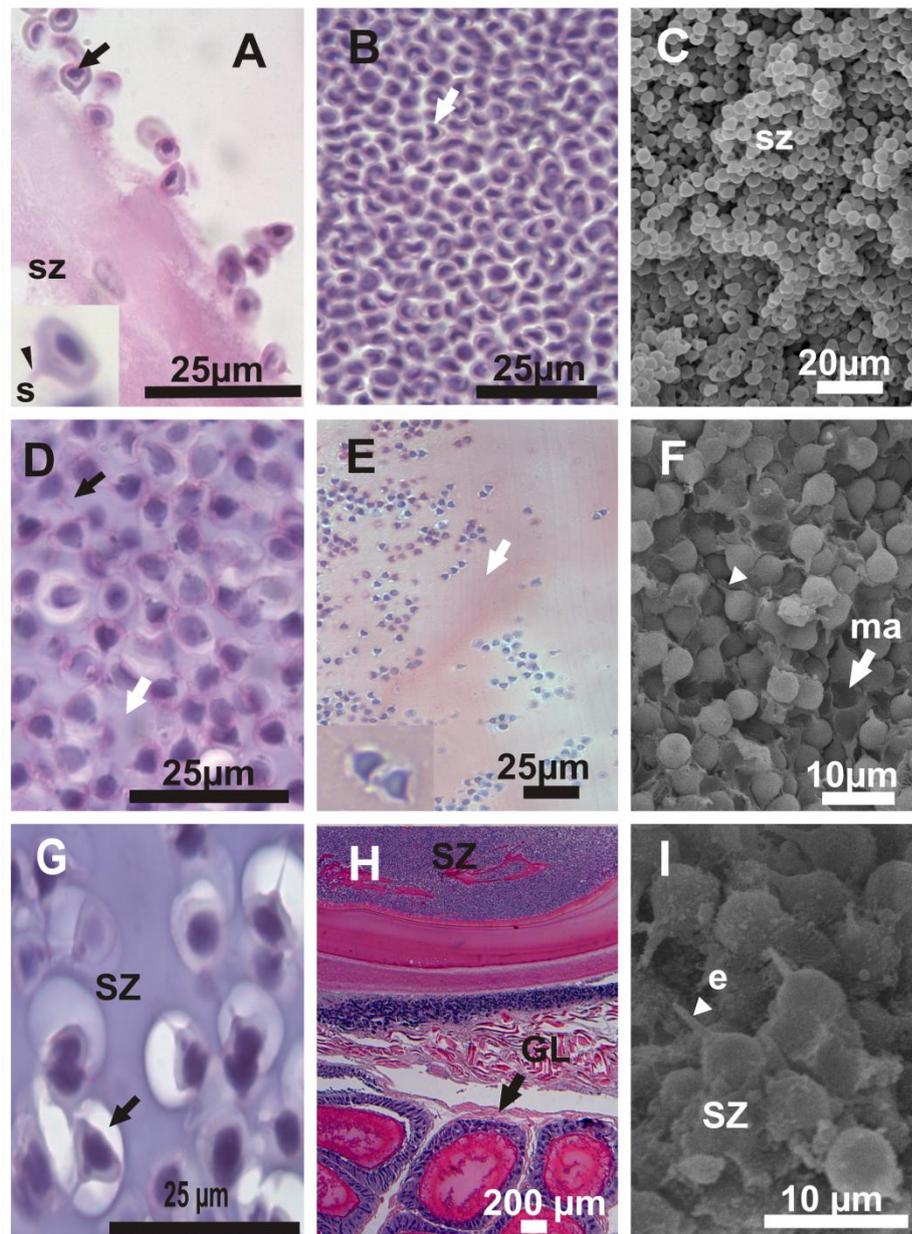


Figura 6. Comparação histológica em HE e ultraestrutural de espermatozoides. Vaso deferente proximal (A-C); vaso deferente médio (D-F); e ampola terminal (G-I). Fotomicrografias das estruturas dos animais frescos (A, D e G), as demais são dos animais *post mortem*. (A) Espermatozoide íntegro com presença de espinho (cabeça de seta preta) e núcleo bem corado; (B) Núcleo fortemente corado e espermatozoide sem espinho; (C) Espermatozoides danificados; (D) A seta preta indica a presença do espinho alongado e presença de secreção no vaso deferente médio (seta branca); (E) Presença de muita secreção (seta branca) e espermatozoides íntegros; (F) Massa adesiva (seta branca) e espermatozoide com espinho (cabeça de seta); (G) Espermatozoides envolvidos no material adesivo e núcleo corado; (H) Ampola terminal com presença de espermatozoides e glândulas; (I) Espermatozoides envolvidos em secreção na ampola terminal, detalhe do espinho (cabeça de seta). e = espinho; GL = glândula de secreção; ma = massa adesiva; SZ = espermatozoide.

3.5 Histoquímica do Vaso deferente médio e espermatóforo

Foram encontrados muitos espermatozoides envoltos em secreção no VDM, que é fortemente acidófila enquanto o núcleo do espermatozoide basófilo (Figuras 7A e B).

O espermatozoide presente no VDM mostrou ausência de reação no núcleo para polissacarídeos neutros, sendo o acrossoma e o espinho intensamente reativos à técnica do PAS (Figura 7C). A secreção do VDM foi positiva ao azul de alcian (AB) (pH 2.5), porém no espermatozoide, somente o acrossoma exibiu intensa reatividade, sendo que o espinho e o núcleo foram negativos para polissacarídeos ácidos (Figura 7D). O VDM foi fortemente positivo ao Xylidine Ponceau, indicando proteínas totais (Figura 7E). No espermatozoide, tanto a base do espinho na altura da inserção no corpo principal (Figura 7H), quanto o acrossoma e o núcleo foram fortemente reativos ao Xylidine Ponceau (Figura 7F). A ampola terminal, e as glândulas secretoras também apresentaram intensa reatividade assim como a massa espermática (Figura 7G). Os resultados histoquímicos para a secreção do VDM e as estruturas do espermatozoide estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3. Dados histoquímicos para secreção do Vaso deferente médio (VDM), espinho, acrossoma e núcleo do espermatozoide de *L. schmitti*. +++ = fortemente positivo; ++ = positivo; + = fracamente positivo; - = negativo.

	Espermatozoide			
	Secreção	Espinho	Acrossoma	Núcleo
PAS (polissacarídeos neutros)	++	+++	+	-
Azul de Alcian (AB) (polissacarídeos ácidos)	++	-	+++	-
Xylidine Ponceau (proteínas totais)	+++	+++	+++	++

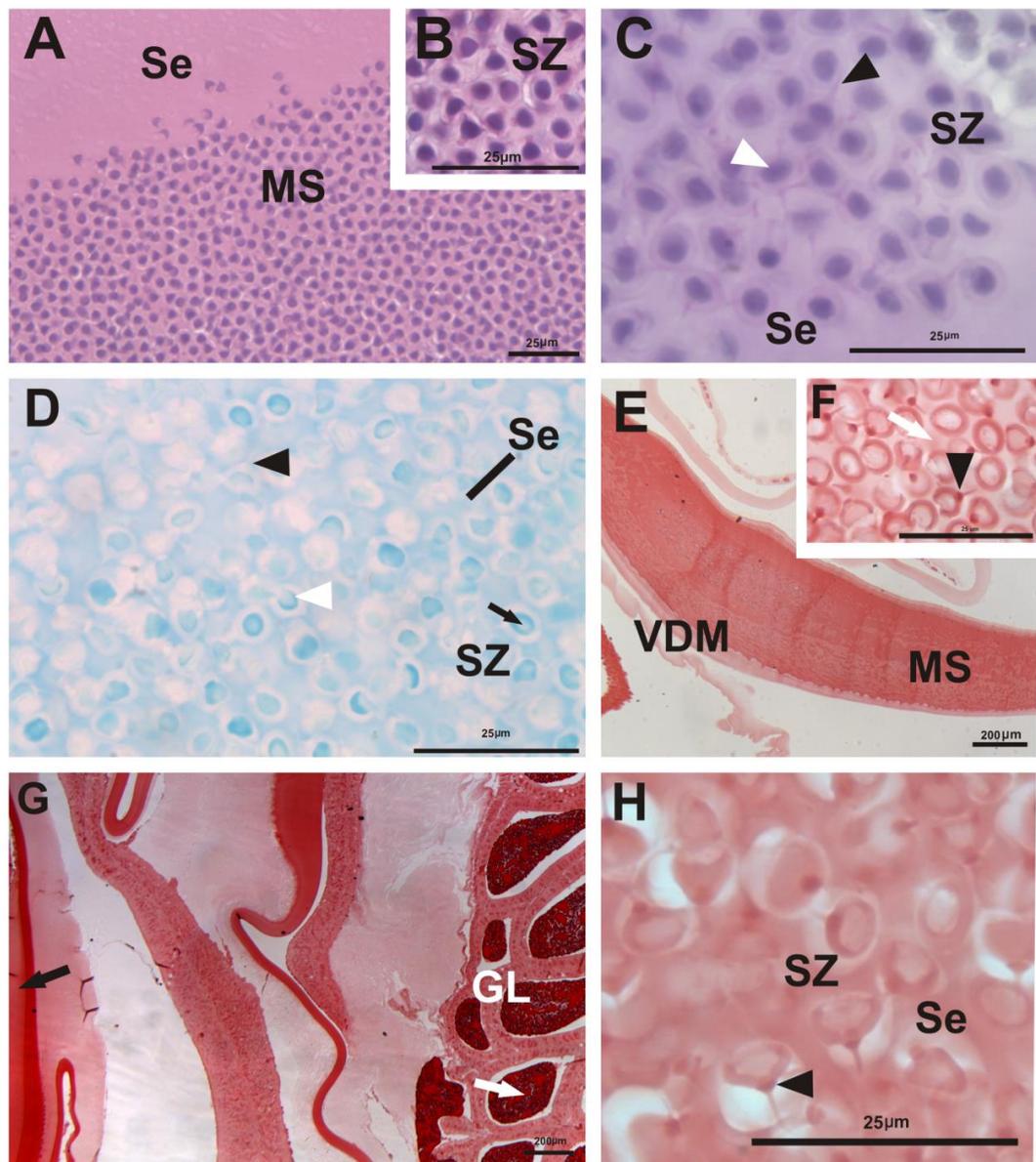


Figura 7. Vaso deferente médio e ampola terminal. Vaso deferente médio (A-E) e ampola terminal (G-H). (A) Vaso deferente médio com secreção homogênea contendo espermatozoide. HE; (B) Detalhe do espermatozoide; (C) Espermatozoides imersos em secreção corados com ácido periódico - Schiff (PAS), secreção e espinho positivos, acrossoma fracamente positivo e núcleo negativo (D) Secreção e acrossoma apresentaram reação positiva (barra preta e cabeça de seta branca), o espinho e o núcleo com ausência de reação ao Azul de Alcian (cabeça de seta e seta preta, respectivamente); (E) Vaso deferente médio fortemente positivo ao Xylidine Ponceau; (F) Secreção (seta branca) e acrossoma (cabeça de seta) fortemente positivos ao Xylidine Ponceau; (G) Glândulas (seta branca) e massa espermática (seta preta) com intensa reação; (H) Base do espinho fortemente reativo ao Xylidine Ponceau. GL = glândula de secreção; MS = massa espermática; Se = secreção; SZ = espermatozoide; VDM = vaso deferente médio.

4 DISCUSSÃO

As características do sistema reprodutor masculino de *L. schmitti* seguem o padrão geral dos camarões peneídeos (KING, 1948; CHOW et al., 1991; BAUER e MIN, 1993, MEDINA, 1994).

Alfaro et al. (2003) observaram na ampola terminal de *Litopenaeus setiferus* o saco espermiático, a massa adesiva e o tiflossole que são estruturas semelhantes às encontradas no *L. schmitti*. Chow et al. (1991) também observaram a presença da ala em *L. setiferus*, porém não encontraram em *L. vannamei* e afirmaram que esta é formada na ampola terminal nas espécies de tético aberto.

Os testículos são formados por túbulos seminíferos, que apresentam espermatogônias localizadas na porção mais periférica destes túbulos, que são envoltos por delgado tecido conjuntivo, marcado pela presença de fibras colágenas. Estas estruturas são encontradas na maioria dos crustáceos decápodos, como nos *Brachyura Armases rubripes* (SANTOS et al., 2009), *Aratus pisonii* (NICOLAU et al., 2012), *Callinectes danae* (ZARA et al., 2012) e em camarão de água doce (Carídea) *Macrobrachium rosenbergii* (POLJAROEN et al., 2010). Estas mesmas estruturas provavelmente serviram de proteção às células espermatogênicas nos testículos dos animais *post mortem* mantendo-as com as características normais. King (1948) observou diferença no tamanho das células germinativas, diferindo dos resultados obtidos no presente estudo em que não houve diferença no tamanho das células quando comparadas no inverno e no verão.

A espermatogênese ocorre em diferentes estágios de maturação nos túbulos seminíferos, tendo sido também observada por Pérez-Jar (2005) para *L. schmitti*. Fransozo (2008) observou, para *X. kroyeri*, todos os estágios celulares da espermatogênese no testículo maduro como observado no presente estudo. As espermatogônias observadas na periferia dos túbulos seminíferos em *L. schmitti* também foram registradas pela autora supracitada; por Nicolau et al. (2012) para o caranguejo *Aratus pisonii* e por Zara et al. (2012) para o siri *C. danae*, onde este último autor observou tanto em animais em desenvolvimento como em maduros.

Zara et al. (2012) descreveram três estágios celulares para a espermiogênese em *C. danae*; o primeiro apresentou as espermátides iniciais com vesícula metacromática pró-acrosomal e núcleo com formato redondo, o segundo apresentou a espermátide intermediária com núcleo grande em forma de “C” e ao redor a vesícula pró-acrosomal, e o terceiro com espermátides tardias ou finais com núcleo fino ao redor da vesícula pró-acrosomal. O presente estudo corrobora com os dados dos autores supracitados para os estágios 1 e 2 quando analisados ao microscópio de luz, entretanto, no estágio 3 ocorre a formação do espinho, não observado em *C. danae*, caracterizando uma diferença morfológica dos espermatozoides entre os Decapodas.

As estações do ano influenciaram o ciclo reprodutivo dos camarões observando-se diferenças na área dos túbulos seminíferos provavelmente devido à atividade reprodutiva dos animais, sugerindo maior atividade de divisão celular no período de verão, o que pode indicar uma maior produção de espermatozoides. Em *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae), Bugnot e Greco (2009) observaram a influência das estações do ano na contagem espermiática, no peso do vaso deferente no verão e qualidade dos espermatozoides confirmando os resultados do presente estudo. Em estudo realizado por King (1948) em *L. setiferus*, os túbulos seminíferos de animais jovens foram maiores no outono que no inverno, sendo o mesmo padrão de desenvolvimento observado para animais adultos no presente estudo. Mossolin e Bueno (2002) observaram a presença de espermatozoides maduros, assim como células em diferentes estágios de desenvolvimento no interior do lúmen testicular, e nas

porções anterior e posterior do vaso deferente independente da estação do ano, sendo o mesmo observado para *L. schmitti* no presente estudo. Ressalta-se que no período de inverno, ocorre um menor investimento na produção de células germinativas, apesar de continuarem sendo produzidas o ano todo.

O ciclo reprodutivo do *L. schmitti* pode apresentar variações sazonais, de acordo com a região geográfica (BUENO, 1990). Neiva et al. (1971) relatou que na Baía de Santos em São Paulo, a reprodução desta espécie é anual e que o período de acasalamento ocorre provavelmente em agosto. Em Tamandaré (PE), Coelho e Santos (1993) observaram reprodução contínua (sendo a mais intensa do inverno ao início do verão), entretanto, Silva (1965) sugeriu que a reprodução na Baía de Sepetiba-RJ se prolongue até o final do verão, devido à presença de larvas avançadas e jovens em março e abril, o que corrobora com o resultado obtido no presente estudo.

Os camarões peneídeos podem apresentar reprodução contínua com ou sem pulsos sazonais (COELHO e SANTOS, 1995). A época de reprodução está relacionada à pluviosidade e temperatura, o que dificulta as comparações realizadas tanto para o *L. schmitti* como as demais espécies, que ocorrem em outras regiões do Brasil (BUENO, 1990). Coelho e Santos (1995) afirmam que diante destes relatos, o pulso de reprodução do camarão *L. schmitti* durante a primavera-verão seria uma constante (ocorre sempre nesta época). Estas observações foram realizadas com base nas fêmeas maduras copuladas e também na presença das larvas nas épocas posteriores à reprodução. Contudo, pela primeira vez essa afirmativa pode ser comprovada através do aumento da área dos túbulos seminíferos dos machos, verificado no presente estudo, inferindo a ocorrência do período reprodutivo na Baía de Sepetiba entre as estações primavera-verão.

Subramoniam (1995) observou ao longo do vaso deferente em *Sicyonia ingentis* diferenças em seu diâmetro, como no presente estudo, a região do vaso deferente proximal é estreita, o vaso deferente médio é dilatado e o distal estreito.

O VDP por apresentar pouca secreção, provavelmente não foi capaz de preservar a morfologia dos espermatozoides em *L. schmitti* nos animais *post mortem*, entretanto nos animais frescos, os espermatozoides se apresentaram dispersos e em maturação, exibindo espinho curto com características normais. Já Subramoniam (1995) encontrou espermatozoides sem espinho em *S. ingentis*, porém observou a dispersão dos espermatozoides no lúmen do VDP, dado semelhante ao observado somente nos animais frescos do presente estudo.

A conformação do espermatozoide observada no presente estudo, com a presença de núcleo, rede filamentosa, acrossoma em forma de capuz, camada fina de citoplasma e o espinho, é típica dos camarões peneídeos, tendo sido também relatada para outras espécies como *S. ingentis* (KLEVE et al., 1980); *L. setiferus* (LEUNG-TRUJILLO e LAURENCE, 1987) e *P. monodon* (PONGTIPPATEE et al., 2007).

No camarão *L. schmitti* do presente estudo, o VDM localizado logo após o VDP apresentou coloração branca leitosa, concordando com Malek e Bawab, (1974), que também observaram em *Penaeus kerathurus* e afirmaram, que nesta região há maior quantidade de secreção comparada ao VDP. No presente estudo, a grande quantidade de secreção produzida no VDM provavelmente foi capaz de proteger os espermatozoides nos camarões *post mortem*, permanecendo as suas características semelhantes aos espermatozoides dos animais frescos. Esta secreção é produzida por células epiteliais e além de servir de proteção, também serve para nutrição dos espermatozoides. Ro et al. (1990) e Chow et al. (1991) observaram que estas células são altamente ativas em síntese e secreção no VDM (porção ascendente) para *L. setiferus* e *L. vannamei*, porém Subramoniam (1995) afirma não haver liberação de secreção nesta região para a espécie *S. ingentis*.

No presente estudo com *L. schmitti*, verificou-se que os espermatozoides com o espinho curto presentes no VDP se alongam no VDM (espermatozoides completamente formados), o mesmo foi observado por Subramoniam (1995) em *S. ingentis* e Alfaro et al. (2007) relataram que em camarões do gênero *Litopenaeus* os espermatozoides se encontram morfológicamente maduros a partir do vaso deferente médio, porém a capacitação dos mesmos ocorre somente no ambiente externo e em contato com a água do ovo.

A matriz espermática observada no VDM de *L. schmitti* é responsável pelo empacotamento e direcionamento dos espermatozoides, dando início a formação do espermatóforo. Esta matriz é envolvida por material acelular, formando o espermatóforo, que no momento da cópula é transferido para a fêmea (BAUER, 1991). A maturação completa dos espermatozoides ocorre no espermatóforo em camarões de tético aberto, entretanto, em animais de tético fechado, a maturação se completa dentro do receptáculo da fêmea (DALL, 1990). Foram observadas a presença de tiflossoles como canais, que dividem o lúmen no VDM em *L. setiferus*, *P. duorarum* e *P. azectus*, assim como em *Trachypenaeus similis* (BAUER e CASH 1991; BAUER e MIN, 1993, respectivamente), estas observações também foram realizadas em *L. schmitti* no presente estudo. Em *P. kerathurus* e *L. setiferus* foram observados a presença da primeira camada do espermatóforo, epitélio e camada do epitélio no VDM por Malek e Bawab (1974b) e Ro et al. (1990), justificando a presença dos canais (tiflossoles) por onde inicia a formação das camadas do espermatóforo.

Ro et al. (1990) observaram que o espermatóforo em desenvolvimento parece não passar do início para o final do VDM de forma involuntária, e sim através de estímulo, como por exemplo, a extrusão do conteúdo da ampola estimularia o movimento de um novo pacote de esperma através do VDM. Estes autores ainda relataram que o número de espermatozoides no espermatóforo maduro é pequeno em relação ao VDM, e desta forma, os canais deferentes médios provavelmente controlariam o volume de esperma enviado para a ampola terminal.

O vaso deferente distal (VDD) é a penúltima região do sistema reprodutor masculino e por onde passam as duas metades do espermatóforo e a matriz espermática que serão encaminhadas para a ampola terminal. Chow et al. (1991) observaram que o VDD de *L. setiferus* e *L. vannamei* é bem mais estreito quando comparado às outras regiões, concordando com o presente estudo.

A ampola terminal em *L. schmitti* apresenta forma cilíndrica, semelhante ao de *L. setiferus*, porém diferente de *L. vannamei* que possui a forma de pera (CHOW et al., 1991). Esta região é constituída por epitélio cilíndrico simples, responsável pela secreção de muco e substâncias adesivas para facilitar a adesão do espermatóforo nas fêmeas (DIAZ et al., 2002; WANG et al., 1995). Neste local ocorrem a deposição e a organização dos componentes do espermatóforo, assim como a finalização da maturação dos espermatozoides.

A ampola terminal é mais complexa nos camarões de tético aberto (*Litopenaeus*) do que em espécies de tético fechado (BAUER e CASH, 1991 e BAUER e MIN, 1993), pelo fato do espermatóforo ficar na região externa da fêmea, completamente desprotegido, diferindo das espécies de tético fechado, onde o espermatóforo permanece protegido no receptáculo das fêmeas. A disposição do material adesivo e do saco espermático, assim como das glândulas no interior do espermatóforo encontrados no camarão *L. schmitti* do presente estudo foi semelhante ao encontrado por Bauer e Cash (1991) em *L. setiferus*.

No presente estudo para *L. schmitti*, não foi observada diferença nas características dos espermatozoides entre o VDM e a ampola terminal, quando se compara os espermatozoides dos animais *post mortem* com os frescos, estando bastante nítidas as características dos mesmos e a presença da secreção através da microscopia eletrônica de varredura. Portanto, mais uma vez pode-se inferir a importância da secreção e das estruturas complexas da ampola terminal na preservação dos espermatozoides. Provavelmente, o fluido seminal, bem como as secreções do tético representam um papel na maturação e capacitação dos espermatozoides

em camarão; porém as comparações das secreções nas diferentes regiões do vaso deferente sobre a maturação dos espermatozoides são escassas para os crustáceos decápodos.

Abraham et al. (2012) dividiram a ampola do camarão *Metapenaeus monoceros* em quatro câmaras e observaram que cada uma delas é revestida por células epiteliais glandulares basófilas, demonstrando intensa atividade secretora. Embora no presente estudo não tenha realizado esta divisão, também foi observada células epiteliais basófilas, concordando com os referidos autores.

A fecundação em *S. ingentis* tem início com a união do espermatozoide ao oócito por meio do espinho, posteriormente inicia a primeira fase da reação acrossômica com a retração do espinho seguida da exocitose da vesícula acrossomal. Logo após, no oócito ocorre a extrusão da camada gelatinosa, formando a corona (membrana de fecundação) em torno do mesmo. A reação acrossômica prossegue e o espermatozoide abaixo da corona é englobado pelo oócito. A fertilização ocorre através da fusão entre as membranas do espermatozoide (transmissão nuclear) e do oócito. A camada gelatinosa torna-se mais espessa impedindo assim a entrada de um segundo espermatozoide (poliespermia) promovendo a expulsão dos espermatozoides excedentes (CLARK et al., 1984). Portanto, a morfologia do espinho é crucial para o sucesso da fecundação para a família Penaeidae (DALL, 1990). Desta maneira, as modificações na morfologia do espinho podem ser consideradas uma anomalia. Como amplamente encontrado na natureza, a espécie *L. schmitti* também apresentou espermatozoide anômalo evidenciado pelo espinho dobrado estando de acordo com os achados de Leung-Trujillo et al. (1987) em que observaram espermatozoides com espinho curto, dobrado, ou ausente.

Bauer (1991) relata que os espermatozoides dos crustáceos não têm flagelos, nem motilidade, tornando necessário o uso de técnicas de coloração (azul de tripano, eosina e nigrosina, entre outros) ou microscopia de fluorescência para a realização da contagem espermática. Desta maneira, os dados obtidos para *L. schmitti* demonstraram que a membrana plasmática dos espermatozoides estava íntegra, indicando fortemente que as células eram viáveis. Contudo, não foi realizada a observação da viabilidade do material genético (DNA) por meio das técnicas de TUNEL ou alaranjado de acridina.

Aungsuchawan (2011) utilizando microscopia eletrônica de transmissão observou dois triângulos eletro-densos na base do espinho de *L. vannamei*, sendo o mesmo observado no presente estudo para *L. schmitti*, porém a sua função ainda não está clara.

Os testes histológicos indicaram que a secreção no VDM é fortemente acidófila e o núcleo do espermatozoide basófilo, sendo que nesta região, o lúmen é preenchido por secreção eosinófila em *L. schmitti*. Estas características também foram observadas em *Aratus pisonii* (NICOLAU et al., 2012) e *C. danae* (ZARA et al., 2012).

No presente estudo, os testes histoquímicos revelaram a presença de polissacarídeos ácidos na secreção do VDM, que também compõe o espermatóforo. Estes polissacarídeos ácidos apresentam a função tática bactericida e quando em contato com a água auxilia na ruptura do espermatóforo para que ocorra a fecundação (SUBRAMONIAM, 1991); o espinho presente no VDM também apresentou estes polissacarídeos.

A presença de polissacarídeos neutros e ácidos para a secreção do VDM em *L. schmitti* são provavelmente necessários para a maturação e manutenção da viabilidade do espermatozoide ao menos por 48h *post mortem*. Assim, este resultado concorda com as proposições para secreção seminal como em outros Brachyura (JEYALECTUMIE e SUBRAMONIAM, 1991; NICOLAU et al., 2012; ZARA et al., 2012). Em *L. schmitti* estes polissacarídeos ácidos também foram encontrados nos espermatóforos. A predominância de polissacarídeos ácidos é comum em Decápodos (MALEK e BAWAB, 1974 a, b), sendo que o intumescimento, que ocorre no espermatóforo é devido à presença destes compostos, inclusive na estrutura da ala.

Segundo Subramoniam (1991) a ocorrência de grande quantidade de mucopolissacarídeo ácido se deve à manutenção da viabilidade do espermatozoide no meio do fluido até a fertilização. A atividade antimicrobiana do mucopolissacarídeo sulfatado assim como o ácido hialurônico e sulfato de condroitina, protegem as células espermáticas quando expostas a água do mar.

Foram observados polissacarídeos neutros nas secreções VDM e ampola terminal em *L. schmitti*. Jeyalectume e Subramoniam (1989) relataram que a formação e maturação do espermátóforo de *S. serrata* ocorrem por meio de alterações bioquímicas com o aumento significativo de proteínas, lipídeos e carboidratos. Estes autores observaram que dentre as substâncias orgânicas, somente os carboidratos apresentam declínio acentuado no receptáculo seminal durante a permanência do espermátóforo no mesmo, sugerindo a glicólise anaeróbica como a forma principal de produzir energia, o que justifica a presença de polissacarídeos neutros encontrados neste trabalho.

No presente estudo, foi detectada a presença de proteína no citoplasma, na secreção do VDM, na ampola terminal e no espermatozoide (espinho, acrossoma e núcleo). Abraham et al. (2012) observaram em *M. monoceros* que as células são produtoras de proteína as quais são liberadas por exocitose para a luz do vaso deferente. Desta forma, a detecção por estes autores de proteína na ampola terminal e nas glândulas secretoras, corrobora com aqueles encontrados para *L. schmitti*. Além disso, a detecção de proteínas pode estar associada a outros eventos. Malek e Bawab (1974b) relataram que o endurecimento das camadas do espermátóforo no camarão *P. kerathurus*, ocorre devido às transformações químicas catalisadas enzimaticamente e a possível ocorrência do endurecimento fenólico (grupo rico em proteínas), por meio da enzima fenolase (processo semelhante ao que ocorre com a cutícula dos insetos). Tendo em vista que o espermátóforo de *L. schmitti* bem como de outros peneídeos são estruturas rígidas, tais proteínas podem ao menos, em parte, estarem relacionadas ao processo proposto por Malek e Bawab (1974b).

Em conclusão, a área dos túbulos seminíferos variou sazonalmente, com produção espermática maior nas estações mais quentes. Contudo, os machos produziram espermatozoides ao longo do ano, o que não inviabiliza a utilização destes animais nas demais estações.

É possível a utilização de espermatozoides provenientes de animais *post mortem* em criopreservação e inseminação artificial, uma vez que a presença das secreções a partir do VDM garantiu a manutenção morfológica dos mesmos.

Pode-se inferir, que a partir das comparações das secreções no vaso deferente médio e ampola terminal em animais frescos e *post mortem* é possível a utilização destes animais para a reprodução, uma vez que os espermatozoides observados estavam morfológicamente normais. Desta maneira, a secreção da VDM exerce um fator protetivo para os espermatozoides mesmo em animais *post mortem*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, J.; MNISSERI, M.K.; SANIL, N.K. Internal anatomy of the ampoule of *Metapenaeus monoceros* (Fabricius, 1798) and its role in spermatophore formation. **Indian Journal Fishery**, v. 59, n. 2, p. 109-113, 2012.
- ALFARO, J. Ultraestructura de la glándula androgénica, espermatogénesis y oogénesis de camarones marinos (Decapoda: Penaeidae). **Revista de Biología Tropical**, 42, 121-129, 1994.
- ALFARO, J.M.; ULATE, K.; VARGAS, M. Sperm maturation and capacitation in the open thelycum shrimp *Litopenaeus* (Crustacea: Decapoda: Penaeoidea). **Aquaculture**, v. 270, p. 436-442, 2007.
- ALFARO, J.M.; MUÑOZ, N.; VARGAS, M.; KOMEN, J. Induction of sperm activation in open and closed thelycum penaeoid shrimps. **Aquaculture**, v.216, p. 371-381, 2003.
- AUNGSUCHAWAN, S.; BROWDY, C.L.; WITHYACHUMNARNKUL, B. Sperm capacitation of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research**, v.42, P. 188-195, 2011.
- BAUER, RT. 1991. Sperm transfer and storage structures in penaeoid shrimp: a functional and phylogenetic perspective. In: BAUER, RT e JW MARTIN (eds.). **Crustacean Sexual Biology**. Columbia University Press, USA, Chap 11: 183-207.
- BAUER, R.T. e CASH, C.E. Spermatophore structure and anatomy of the ejaculatory duct in *Penaeus setiferus*, *P. duorarum* and *P. aztecus* (Crustacea: Decapoda): homologies and functional significance. **Transactions of the American Microscopical Society**, 110, v.2, 144-162. 1991.
- BAUER, R.T. e MIN, L.J. Spermatophores and Plug Substance of the Marine Shrimp *Trachypenaeus similis* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae): Formation in the Male Reproductive Tract and Disposition in the Inseminated Female. **Biological Bulletin**, 185, p. 174-185, 1993.
- BELL, T.A. e LIGHTNER, D.V. Manual de histología del camarón penaeido normal. **World Aquaculture Society**. Aquaculture Development Program, State of Hawaii, 114p, 1988.
- BRAGA, A.L.S. Ultraestrutura do espermatozoide e efeito da alimentação na qualidade espermática do camarão rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda). **Dissertação (Mestrado em Oceanografia)**. Universidade Federal do Rio Grande, 2009. 83p.
- BUENO, S.L.S. Maturation and spawning of the white shrimp *Penaeus schmitti* Burkenroad, 1936, under large scale rearing conditions. **World Aquaculture Society**, v. 21, n. 3, p.170-179, 1990.
- BUGNOT, A.B. e LÓPEZ-GRECO, L. Sperm production in the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). **Aquaculture**, v. 295, p. 292-299, 2009.

CAMPOS, B.R.; DUMONT, L.F.C.; D'INCAO, F.; BRANCO, J.O.J. Ovarian development and length at first maturity of the sea-bob-shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller) based on histological analysis. **Nauplius**, v. 17, n. 1, p. 9-12, 2009.

CASTIGLIONI, D.S.; FRANSOZO, M.L.N.; LÓPEZ-GRECO, L.S.; SILVEIRA, A.F.; SILVEIRA, S.O. Gonad development in females of *Uca rapax* (Smith, 1870) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae) using macro and microscopic techniques. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 97, p. 505-510, 2007.

CHOW, S.; DOUGHERTY, M.M.; DOUGHERTY, W.J.; SANDIFER, P.A. Spermatophore formation in the white shrimps *Penaeus setiferus* and *P. vannamei*. **Journal of Crustacean Biology**, v.11, n.2, p. 201-216, 1991.

CLARK JR., W.H., YUDIN, A.I., GRIFFIN, F.J., SHIGEKAWA, K. 1984. The control of gamete activation and fertilization in the marine Penaeidae, *Sicyonia ingentis*. In: ENGELS, W., CLARK JR., W.H., FISHER, A., OLIVE, P.G.W., WENT, D.F. (Eds.), **Advances in Invertebrate Reproduction**, vol. 3. Elsevier Science Publisher, Amsterdam, The Netherlands, pp. 459–472.

COELHO, P.A. e SANTOS, M.C.F. Época da reprodução do camarão branco, *Penaeus schmitti* Burkenroad (Crustacea, Decapoda, Penaeidae, na região de Tamandaré, PE. **Boletim Técnico Científico CEPENE**, Rio Formoso, v. 1, p. 157-171, 1993.

COELHO, P.A. e SANTOS, M.C.F. Época da reprodução dos camarões *Penaeus schmitti* Burkenroad, 1936 e *Penaeus subtilis* Pérez-farfante, 1967 (Crustacea, Decapoda, Penaeidae), na região da Foz do Rio São Francisco. **Boletim Técnico Científico CEPENE**, Tamandaré, v.3, n.1, p.122 – 140, 1995.

DALL, W.; HILL, B.J.; ROTHLSBERG, O.C.; STAPLES, D.J. 1990. The biology of the Penaeidae. In: BLAXTER, J.H. e SOUTHWARD, A.J. (eds.). **Advances in Marine Biology**. Academic Press, UK, vol. 27, 489p., 1990.

DIAZ, A.C.; GIMENEZ, F.A.V.;PETREL, A.M.; FENUCCI, J.L. Morphological and functional study of the male reproductive tract in the shrimp *Pleoticus muelleri* Bate (Decapoda, Penaeoide). **Invertebrate Reproduction and Development**. v. 42, n. 1, p. 69-74, 2002.

DOUGHERTY, W.J. Oriented spermatozoa in the spermatophore of the palaemonid shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*. **Tissue e Cell**, v.19, p. 145-152, 1987.

FELGENHAUER, B.E. e ABELE, L.G. 1991. Morphological diversity of decapod spermatozoa. In: Bauer, R. T. and Martin, J. W. (Eds): **Crustacean Sexual Biology**, pp. 322–341. Columbia University Press, New York, NY, USA.

FRANSOZO, V.N. Morfologia dos caracteres sexuais secundários e caracterização gonadalmasculina em *Xiphopenaeus kroyeri* (HELLER, 1862) (Crustacea, Dendrobranchiata, Penaeoidea). **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)**. Universidade Estadual Paulista, 2008. 73p.

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

- KAO, H.C.; CHAN, T.Y.; YU, H.P. Ovary Development of the Deep-water Shrimp *Aristaeomorpha foliacea* (Risso, 1826) (Crustacea: Decapoda: Aristeidae) from Taiwan **Zoological Studies**, v.38, n.4, p. 373-378, 1999.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal Cell Biology**, v.27, 137A, 1965.
- KING, J.E. A study of the reproductive organs of the common marine shrimp, *Penaeus setiferus* (Linnaeus). **Biological Bulletin**, v.94, p. 244-262, 1948.
- KLEVE, M.G.; YUDIN, A.I.; CLARK JR, W.H. Fine structure of the unistellate sperm the shrimp, *Sicyonia ingentis* (Natantia). **Tissue e Cell**, v.12, n.1, p. 29-45, 1980.
- LEUNG-TRUJILLO, JR e LAWRENCE, A.L. Observations on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions. **Aquaculture**, v. 65, p. 363– 370. 1980.
- MACHADO, I.F.; DUMONT, L.F.C.; D'INCAO, F. Stages of gonadal development and mean length at first maturity of wild females of white shrimp (*Litopenaeus schmitti* – Decapoda, Penaeidae) in Southern Brazil. **Atlântica**, Rio Grande, v. 31, n.2, p. 169-175, 2009.
- MALEK, S.R.A. e BAWAB, F.M. The formation of the spermatophore in *Penaeus kerathurus* (FORSKAL, 1775) (DECAPODA, PENAEIDAE): I The initial formation of a sperm mass. **Crustaceana**, v. 26, n.3, p. 273-285, 1974a.
- MALEK, S.R.A. e BAWAB, F.M. The formation of the spermatophore in *Penaeus kerathurus* (FORSKAL, 1775) (DECAPODA, PENAEIDAE): II The deposition of the main layers of the body and of the wing. **Crustaceana**, v. 27, n.1, p. 73-83, 1974b.
- MEDINA, A.; VILA, Y.; MOURENTE, G.; RODRÍGUEZ, A. A comparative study of the ovarian development in wild and pound-read shrimp, *Penaeus kerathurus* (Forsk., 1775). **Aquaculture**, v. 148, p. 63-75, 1994.
- MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C. **Práticas de Biologia Celular**. FUNCAMP. Editora Edgard Blücher LTDA, Campinas-SP, 71p., 1980.
- MOSSOLIN, E.C. e BUENO, S.L.S. Reproductive biology of *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae) in São Sebastião, Brazil. **Journal of Crustacean Biology**, v.22, n. 2, p. 367-376, 2002.
- NEIVA, G.S.; SANTOS, E.P.; JANKUSKIS, V. Análise preliminar da população de camarão legítimo *Penaeus schmitti* Burkenroa, 1936, na Baía de Santos - Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 1, n. 2, p. 7-14, 1971.
- NICOLAU, C.F.; NASCIMENTO, A.A.; MACHADO-SANTOS, C.; SALES, A.; OSHIRO, L.M.Y. Gonads of males and females of the mangrove tree crab *Aratus pisonii* (Grapsidae: Brachyura: Decapoda): a histological and histochemical view. **Acta Zoologica (Stockholm)**, v. 93, n. 2, p. 222–230, 2012.
- PEIXOTO, S.; CAVALLI, R.O.; D'INCAO, F.; MILACH, A.O.E.M.; WASIELESKY, W. Ovarian maturation of wild *Farfantepenaeus paulensis* in relation to histological and visual changes. **Aquaculture Research**, v. 34, p. 1255-1260, 2003.

PEIXOTO, S.; CAVALLI, R.O.; D'INCAO, F.; WASIELESKY, W.; MILACH, A.O.E.M. A comparative study of the ovarian histology of eyestalk ablated and unablated *Farfantepenaeus paulensis* after spawning. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 71-76, 2002.

PEIXOTO, S.; COMAN, G.; ARNOLD, S.; CROCOS, P.; PRESTON, N. Histological examination of final oocyte maturation and atresia in wild and domesticated *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. **Aquaculture Research**, v.36, p. 666-673, 2005.

PÉREZ-JAR, L. Fisiología y calidad reproductiva de machos de camarón blanco *Litopenaeus schmitti* en condiciones de cautiverio. **Tesis (Doctorado en Ciencias)**. Centro de investigaciones biológicas del Noroeste, La Paz, 2005. 150p.

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.

PONGTIPPATEE, P; VANICHVIRIYAKIT, R; CHAVADEJ, J; PLODPAI, P; PRATOOMCHART, B; SOBHON, P; WITHYACHUMNARNKUL, B. Acrosome reaction in the sperm of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda, Penaeidae). **Aquaculture Research**, v. 38, p. 1635-1644, 2007.

RO, S.; TALBOT, P.; LEUNG-TRUJILLO, J.; LAWRENCE, A.L. Structure and function of the vas deferens in the shrimp *Penaeus setiferus*: Segments 1-3. **Journal of Crustacean Biology**, v. 10, n. 3, p. 455-468, 1990.

SANTOS, C.M.; LIMA, G.V.; NASCIMENTO, A.A.; SALES, A.; OSHIRO, L.M.Y. Histological and histochemical analysis of the gonadal development of males and females of *Armases rubripes* (Rathbun 1897) (Crustacea, Brachyura, Sesarmidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, p. 161-169, 2009.

SAS, Statistical Analysis Software. User's Guide, 4ed Cary,NC: SAS Inst.Inc , v.2, 1990.100p.

SHIGEKAWA, K. e CLARK JR, W.H. Spermiogenesis in the Marine Shrimp, *Sicyonia ingentis*. **Development Growth and Differentiation**, v. 28, n.2, p. 95-112, 1986.

SILVA, O. **Alguns peneídeos e palinurídeos do Atlântico Sul**. Rio de Janeiro: SUDEPE, 1965, 20p.

SUBRAMONIAM, T. 1991. Chemical composition of spermatophores in decapod crustaceans. In: BAUER, RT e JW MARTIN (eds.). **Crustacean Sexual Biology**. Columbia University Press, USA. Chap 17: 308-321.

SUBRAMONIAM, T. Light and electron microscopic studies on the seminal secretions and the vas deferens of the penaeiodean shrimp, *Sicyonia ingentis*. **Journal of Bioscience**, v. 20, n. 5, p 691-706, 1995.

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, n. 2, p. 249-262, 2012.

WANG, Q.; 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, n. 3, p. 261-271, 1995. 1995.

CAPÍTULO II

CRIOPRESERVAÇÃO DA MASSA ESPERMÁTICA E ESPERMATÓFORO DO CAMARÃO BRANCO

LITOPENAEUS SCHMITTI

RESUMO

O presente trabalho foi realizado em duas etapas, a primeira para avaliar a eficiência de dois protocolos (A e B) utilizando Glicerol (10%) como crioprotetor e a segunda, a eficiência de dois crioprotetores (Glicerol e Dimetilsulfóxido - DMSO a 10%) e o tempo (0, 30, 60 e 90 dias) para a criopreservação da massa espermática e espermátóforo de camarões *post mortem* da espécie *Litopenaeus schmitti*. O protocolo A apresentou velocidade de resfriamento de 0,5°C/min até alcançar -32°C e o protocolo B, 20°C/min até alcançar -120°C, sendo posteriormente os materiais transferidos para o nitrogênio líquido (N₂L). A viabilidade espermática foi avaliada através do esfregaço de sêmen corado com eosina-nigrosina. A curva que resultou na maior média de sobrevivência espermática foi a do protocolo A (50,9%). Portanto, para o segundo trabalho foi utilizando o protocolo A, entretanto neste não houve diferença entre os crioprotetores para a massa espermática, contudo o tempo influenciou na sobrevivência. Foi observada diferença entre os crioprotetores e a influência do tempo na sobrevivência espermática dos espermátóforos criopreservados. O Glicerol a 10% foi mais eficiente para a criopreservação dos espermátóforos, porém para as massas espermáticas, ambos podem ser utilizados.

Palavras-chave: protocolos; massa espermática; espermátóforo; dimethyl sulfoxide; glicerol.

ABSTRACT

This study was carried out two stages, the first to evaluate the viability of two protocols (A and B) using Glycerol (10%) as a cryoprotectant and the second, the efficiency of two cryoprotectants (Glycerol and 10% DMSO) and times (0, 30, 60 and 90 days) for the cryopreservation of sperm mass and *post-mortem* spermatophores shrimps *Litopenaeus schmitti* species. The protocol presented A cooling rate of 0.5°C/min until reaching -32°C and protocol B, 20°C/min to reach -120°C, after which the materials transferred to liquid nitrogen (N₂L). The sperm viability was assessed by the smearing of semen stained with eosin-nigrosin. The curve resulted in higher mean sperm survival was Protocol A (50.9%). Therefore, for the second work was using the protocol, however in this was not differ between the cryoprotectants for sperm mass, although the influence on survival time. Difference was observed between the cryoprotectants and the influence of time on sperm survival of cryopreserved spermatophores. Glycerol to 10% was more efficient for cryopreservation spermatophore, but for the masses sperm, both can be used.

Keywords: Protocols; sperm mass; spermatophore; dimethyl sulfoxide, glycerol.

1 INTRODUÇÃO

A criopreservação do espermátóforo é um método valioso na restauração de espécies em perigo de extinção, bem como uma técnica para manipulação reprodutiva e a melhoria genética do camarão (MEMON et al., 2012).

Independentemente da técnica, todos os métodos de criopreservação necessitam de crioprotetores, estes permitem uma redução do ponto de solidificação das soluções durante o congelamento (GONÇALVES et al., 2008). Os crioprotetores são divididos em duas categorias, intracelulares e extracelulares (SANTOS et al., 2008). Os intracelulares protegem as organelas das células durante o resfriamento, constituídos por moléculas com baixo peso molecular, desta maneira, podem atravessar as membranas celulares com relativa facilidade, sendo os mais empregados, DMSO, Glicerol, Propanodiol, Etilenoglicol e Propilenoglicol (GONÇALVES et al., 2008).

Os crioprotetores extracelulares são as macromoléculas e açúcares cujas funções são reduzir a formação de gelo, facilitar a desidratação das células e proteger a membrana celular, possuem alto peso molecular não podendo permear as células (HOVATTA, 2005). Os mais utilizados são a sacarose, a rafinose, a trealose e as proteínas como as presentes no soro fetal bovino. Tanto os crioprotetores intracelulares como os extracelulares podem ser usados separadamente ou associados para diferentes tipos de protocolo de criopreservação.

Durante o congelamento, à medida que as células são resfriadas a temperaturas entre -5 e -15°C, ocorre inicialmente a formação de gelo no meio extracelular (MAZUR et al., 1984). Com a continuidade da redução da temperatura, a quantidade de gelo aumenta e os solutos concentram-se no meio extracelular criando um gradiente osmótico (ELMOAZZEN, 2000). A partir desse estágio, os eventos físicos subsequentes dependem da velocidade de congelação. Se a taxa de congelação for rápida, a formação de cristais de gelo na solução extracelular ocorre de forma mais rápida do que o efluxo de água das células; a desidratação não ocorre, o citoplasma se torna cada vez mais super-resfriado e, eventualmente, a solução intracelular, que contém alto teor de água livre, congela-se, formando cristais de gelo intracelular (KARLSSON et al., 1993). Por outro lado, sob baixas taxas de congelação ocorre uma progressiva desidratação celular, concentrando solutos intracelulares para eliminar o super-resfriamento do citoplasma e manter o potencial químico da água intra e extracelular em equilíbrio. Como os cristais de gelo são incapazes de atravessar a membrana celular, a nucleação do gelo intracelular é impedida, a água move-se para fora da célula e congela externamente, evitando a formação de cristais de gelo intracelular (FRIEDLER et al., 1988). No entanto, nas duas situações – velocidade de congelação rápida ou lenta – danos celulares poderão ocorrer (ELMOAZZEN, 2000).

O processo conhecido por seeding é necessário para reduzir a formação de cristais de gelo intracelular e para isto, induz-se a formação de gelo extracelular (seeding); e este processo previne o supercongelamento da célula e inicia o processo de desidratação (SHAW, 1993; GONÇALVES et al., 2008). A indução do seeding pode ser realizada manualmente através do toque de um objeto de metal pré-resfriado a -196°C na parede dos criotubos ou palhetas (FABBRI, 2006; GONÇALVES et al., 2008). Outra forma de reduzir ou evitar a formação de cristais de gelo intracelular pode ser através de uma desidratação celular adequada (SHAW et al., 2000), uma vez que a redução da água intracelular diminui os danos causados pelo procedimento do congelamento.

Mesmo as células sendo criopreservadas de forma adequada, o descongelamento inadequado pode causar danos às mesmas, ou seja, a sua morte. As células precisam de tempo

para se reidratar, mas também necessitam descongelar rapidamente para que os cristais de gelo não se formem durante este processo e se tornem grandes o suficiente para matá-las (RESENDE, 2009).

O uso da criopreservação para a conservação espermática tem como princípio a redução do metabolismo celular e, conseqüentemente, o prolongamento da vida útil das células. A eficiência desta técnica baseia-se em evitar a exposição dos espermatozoides aos efeitos do choque térmico. Desta maneira, a solução conservadora deve possuir elementos crioprotetores e os ritmos (taxas) de congelamento e descongelamento controlados (MIES FILHO, 1982).

O processo de criopreservação possui várias etapas que podem danificar os espermatozoides, tais como: a mudança da temperatura, o estresse osmótico e tóxico causado pela exposição aos agentes crioprotetores e a formação e dissolução de gelo no ambiente extracelular (ALMEIDA, 2006). Porém, a utilização destes crioprotetores é necessária, pois na sua ausência ocorre a formação de cristais de gelo que são considerados letais para as células (LEIBO, 2000). Estes efeitos variam devido aos agentes crioprotetores, tempo de equilíbrio (tempo de exposição) e concentração destes (MORRIS, 1981).

Segundo Memon (2012) o tempo de equilíbrio no momento do resfriamento lento permite que o espermatozoide e o diluente se misturem para a diminuição lenta da temperatura preparando-se para o processo de congelamento. O tempo de equilíbrio também pode evitar um choque térmico do espermatozoide durante o congelamento.

Bart et al. (2006) relataram o sucesso da criopreservação do espermatóforo do camarão *Penaeus monodon* mantidos em nitrogênio líquido por dois dias, bem como Vuthiphandchai et al. (2007) que criopreservaram espermatóforos desta mesma espécie por 210 dias.

O camarão *Litopenaeus schmitti*, objeto de estudo do presente trabalho é uma espécie abundante nas pescas artesanais na Baía de Sepetiba - RJ e apenas um trabalho sobre criopreservação foi realizado testando dois tempos de equilíbrio, 10 e 30 minutos em Glicerol e DMSO a 5 e 10% utilizando massa espermática (de camarões frescos) e a criopreservação da mesma em glicerol a 5 e 10% (CASTELO-BRANCO, 2010).

O presente trabalho foi o primeiro a ser realizado com o emprego de sêmen ou espermatóforo de Decápodos *post mortem* para a criopreservação, visando maximizar a utilização do potencial reprodutivo dos camarões machos, pois os demais estudos utilizaram espermatóforos ou massas espermáticas oriundos de animais vivos.

Desta forma, este trabalho foi dividido em dois ensaios: o primeiro teve como objetivo avaliar a viabilidade de dois protocolos de congelamento (utilizando Glicerol a 10%); e o segundo, avaliar a eficiência de dois crioprotetores (Glicerol e DMSO a 10%) na criopreservação tanto da massa espermática, quanto do espermatóforo, utilizando o melhor protocolo do ensaio anterior, permanecendo até 90 dias em nitrogênio líquido.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e coleta dos animais

Os camarões machos adultos de *L. schmitti* (camarões *post mortem*, aproximadamente a 48h) utilizados nos ensaios foram oriundos da pesca artesanal da Baía de Sepetiba (Saco da Pombeba - latitude 23° 3'13.91"S e longitude 43°54'44.93"O). Foram adquiridos 55 machos adultos em Fev/11, para compor o primeiro ensaio e 65 em Ago/11 para o segundo ensaio.

2.2 Tratamentos experimentais

O trabalho foi realizado em duas etapas, sendo que na primeira, os tratamentos foram distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial duplo (2 x 2), com cinco repetições, sendo os fatores de estudo: protocolos de congelamento (curvas) em dois níveis e duas formas de congelamento com dois níveis (massa espermática e espermatóforo). Para a segunda etapa foi utilizado o delineamento em blocos inteiramente casualizados em arranjo fatorial 2x4 com 10 repetições, para testar os efeitos de 2 crioprotetores (Glicerol e DMSO) e 4 tempos com relação à sobrevivência espermática (0, 30, 60 e 90 dias).

2.3 Procedimentos experimentais

Foram realizados dois experimentos em períodos diferentes, o primeiro (Fev/11) determinou o protocolo para congelamento e o segundo (Ago/11) a criopreservação utilizando o melhor protocolo. Foi utilizado um equipamento para criopreservação (TK 3000 compacta SE) computadorizado e com vários protocolos para criopreservação de sêmen e embriões, controlando a temperatura de acordo com o protocolo selecionado.

Inicialmente foram tomados as medidas de peso e comprimento dos animais (comprimento total e comprimento da carapaça) por meio de balança analítica de precisão 0,001g e paquímetro digital, respectivamente. O comprimento total consistiu na medida da extremidade do rostro até a extremidade do telson. O comprimento da carapaça foi medido da base do pedúnculo ocular até a extremidade posterior da carapaça (Figura 1).

Foram utilizados 65 espermatóforos de machos maduros no período de intermuda, selecionados de acordo com as especificações segundo o padrão de qualidade sugerido por Pérez-Jar (2005) em relação à sua aparência: coloração branca, de tamanho grande e túrgidos.

Os espermatóforos completamente maduros foram removidos pela técnica de leve compressão abdominal (ARCE et al.,1999 e NIMRAT et al., 2006) e em seguida foram medidos com paquímetro com precisão de 0,01mm e pesados em balança analítica com precisão 0,001 g.

As massas espermáticas foram extrusadas por meio de leve compressão na extremidade posterior do espermatóforo, e posteriormente, tanto os espermatóforos quanto as massas espermáticas foram imersos em solução salina livre de cálcio (Tab. 1).

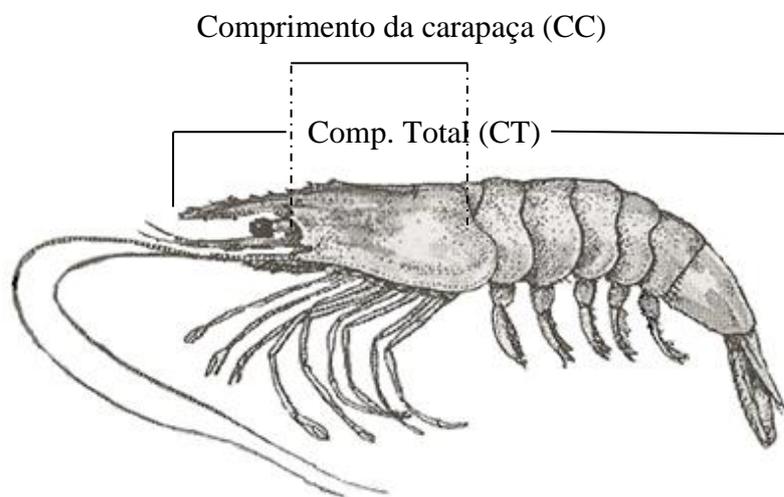


Figura 1. Medidas biométricas. Comprimento total (CT) e comprimento da carapaça (CC).

As massas espermáticas e os espermatóforos foram imersos em Glicerol na concentração de 10% (v:v), diluídos em solução salina livre de cálcio (Tabela 1). (VUTHIPHANDCHAI et al., 2007), à temperatura ambiente (25°C) por 30 minutos (tempo de equilíbrio).

Tabela 1. Composição da solução salina.

Reagentes	Quantidade
NaCl	2,163 g
KCl	0,112 g
H ₃ BO ₃	0,053 g
NaOH	0,019 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,493 g
H ₂ O destilada	100 mL q.s.p.

A viabilidade espermática foi avaliada através do esfregaço de sêmen corado com eosina-nigrosina (Sigma N4763 e E6003 respectivamente), segundo Jeyalectumie e Subramoniam (1989), com pequena alteração, onde foram adicionados 25 µL de eosina a 0,5% e 25 µL de nigrosina a 10%, em 50 µL de solução espermática. Após a homogeneização de 100 µL resultantes de solução corada, realizou-se o esfregaço em lâmina de microscopia para observação em microscópio óptico. 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 2 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 2).

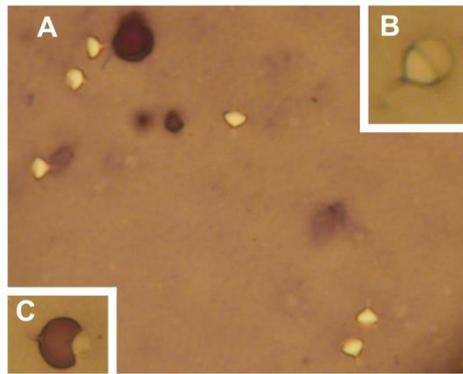


Figura 2. Esfregaço em lâmina da massa espermática do camarão *L. schmitti*, corado com eosina e nigrosina e observado em microscópio óptico em aumento 40x. (A) células vivas e mortas; (B) célula viva; (C) célula morta.

Primeira Etapa: Avaliação de duas Curvas para a definição de um protocolo

Para o protocolo A foram utilizados machos com peso médio de $22,80 \pm 3,87$ g, comprimento total médio de $13,59 \pm 0,81$ cm e comprimento da carapaça médio de $2,96 \pm 0,2$ cm. O comprimento e o peso médios dos espermatozoides foram $0,87 \pm 0,1$ cm e $0,14 \pm 0,03$ g, respectivamente. E para o protocolo B os animais apresentaram peso médio de $22,75 \pm 2,05$ g, comprimento total médio de $13,52 \pm 0,59$ cm e comprimento da carapaça médio de $2,97 \pm 0,09$ cm. O comprimento e o peso médios dos espermatozoides foram $0,84 \pm 0,05$ cm e $0,15 \pm 0,11$ g, respectivamente.

As massas espermáticas e os espermatozoides permaneceram em equilíbrio por 30 minutos em Glicerol 10% (Sigma, G6279), à temperatura ambiente (25°C) e posteriormente foram criopreservados utilizando os protocolos mencionados a seguir.

O protocolo A do equipamento Compacta TK 3000, semelhante ao utilizado por Salazar et al. (2008) para criopreservação de sêmen do camarão *L. vannamei*, realizou a criopreservação em duas etapas, onde inicialmente ocorreu a estabilização a -6°C e posteriormente a inserção das palhetas com capacidade para 0,5mL e criotubos 2mL contendo a solução de massa espermática e espermatozoides, respectivamente e o crioprotetor. Após 2 minutos realizou-se o procedimento de seeding (indução artificial da cristalização de gelo, geralmente através do contato de uma pinça previamente imersa em nitrogênio líquido (N_2L), no sentido de evitar o super-resfriamento das células) em seguida, a máquina foi novamente estabilizada por 10 minutos. Posteriormente, iniciou-se a redução da temperatura de -6°C a -32°C , a uma velocidade de resfriamento de $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, segundo o protocolo de Salazar et al. (2008). As amostras permaneceram por mais 8 minutos no equipamento antes de serem transferidas para o nitrogênio líquido (-196°C) (Tab. 2).

O protocolo B, teve início a partir da temperatura ambiente sendo a queda da mesma de $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até alcançar 5°C (denominada de fase positiva), na fase negativa (introdução do N_2L no recipiente da máquina de criopreservação e posterior imersão do porta palhetas ou criotubos no N_2L), a queda da temperatura reduziu $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até alcançar -120°C , quando então o material foi submerso em N_2L (Tab. 2).

Tabela 2. Protocolos utilizados para criopreservação da massa espermática e do espermatóforo do camarão branco *L. schmitti*.

Protocolo A		Protocolo B	
Início - a partir do 1º patamar		Início - a partir da temperatura ambiente	
Temperatura 1º patamar	-6°C	Rampa Positiva	0,5°C p/ min
Cristalização	2 min	1º Patamar	+ 5°C
Tempo para rampa	10 min	Rampa Negativa	20°C p/ min
Rampa	0,5 °C p/ min	Patamar Final	- 120°C
Temperatura 2°C patamar	-32°C		
Tempo - 2°C patamar	5 min		

Concluídos os tempos de manutenção em N₂L (30, 60 e 90 dias), as massas espermáticas foram retiradas do nitrogênio líquido e imediatamente imersas em água à 20°C por 10 segundos para a descongelamento, segundo o protocolo utilizado por Salazar et al. (2008); e 30°C por 2 minutos segundo Bart et al. (2006) e Vuthiphandchai et al. (2007) para os espermatóforos.

Segunda Etapa: Criopreservação

O peso médio dos animais foi de 29,86 ± 3,19 g, comprimento total médio de 15,03 ± 0,56 cm e comprimento da carapaça médio de 3,19 ± 1,15 cm. O comprimento e o peso médios dos espermatóforos foram 0,96 ± 0,07 cm e 0,19 ± 0,02g, respectivamente.

O período de criopreservação ocorreu durante cinco dias consecutivos, onde diariamente foram retirados os espermatóforos de 13 machos, totalizando 130 espermatóforos.

Nesta etapa foram criopreservadas duas amostras por dia para cada tratamento, totalizando 10 repetições por tratamento e duas amostras foram avaliadas diariamente, referentes ao controle durante o período de congelamento (cinco dias) (Figura 3).

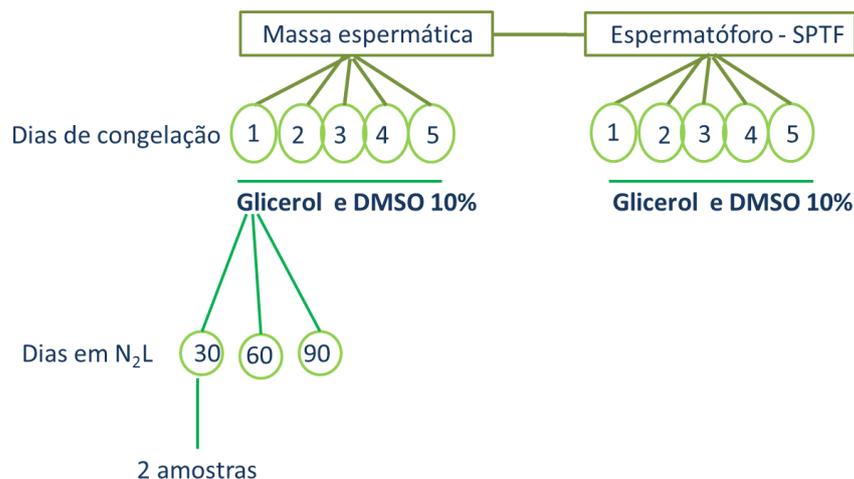


Figura 3. Esquema do congelamento das massas espermáticas e espermatóforos.

Foi realizada a criopreservação das massas espermáticas e espermatóforos em Glicerol e DMSO (Sigma, D4540) ambos a 10% utilizando o protocolo definido na primeira fase experimental.

As massas espermáticas foram inseridas em palhetas de 0,5mL e posteriormente vedadas com álcool polivinílico. Os espermatóforos foram colocados em criotubos com capacidade para 2mL. Ambos permaneceram nas respectivas soluções crioprotetoras por 30 minutos, antes de serem transferidas para o equipamento de criopreservação.

Como a criopreservação foi realizada durante cinco dias consecutivos, o descongelamento seguiu o mesmo procedimento.

2.4 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk; $\alpha= 5\%$) e homocedasticidade (Levene; $\alpha= 5\%$) das variâncias, a fim de verificar as premissas para a realização da ANOVA ($\alpha= 5\%$). Foi utilizado o teste F ($P=0.05$) na comparação das médias da massa espermática e a Análise de Regressão Linear, para a variável sobrevivência espermática, utilizando-se o pacote estatístico SAEG v.9.1 (UFV, 2007). Foi realizada uma análise de covariância (ANCOVA; $\alpha= 5\%$), para comparação das regressões obtidas para o espermatóforo. A comparação entre os tempos (30, 60 e 90 dias) das amostras dos espermatóforos mantidas em nitrogênio líquido foi realizada por meio do teste Kruskall-Wallis. As parcelas perdidas foram corrigidas pela equação:

$$y = \frac{k.T + r.B - G}{(k-1)(r-1)}$$

Onde:

y = valor estimado da parcela;

k = número de tratamentos;

r = número de blocos;

T = total das parcelas do tratamento com parcela perdida;

B = total das parcelas do bloco com a parcela perdida;

G = soma de todas as parcelas existentes no experimento.

3 RESULTADOS

3.1 Definição do protocolo para criopreservação

A curva que resultou na sobrevivência espermática média significativamente superior foi a do protocolo A (50,96%) em que a velocidade da queda da temperatura foi de 0,5°C/min até atingir -32°C, em relação ao protocolo B (7,13%) (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios e desvios padrões das curvas de criopreservação da massa espermática e do espermatóforo (SPTF) de *L. schmitti*.

SOBREVIVÊNCIA ESPERMÁTICA			
Curvas de congelamento	MASSA	SPTF	X
PROTOCOLO A (-32°C)	43,57 ± 15,74	58,35 ± 20,74	50,96 ± 19,59 a
PROTOCOLO B (-120°C)	1,99 ± 3,48	12,26 ± 16,05	7,13 ± 12,55 b

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelos testes F, a 5% de probabilidade.

3.2 Avaliação dos crioprotetores e métodos (massa espermática e espermatóforo) para criopreservação

De acordo com a análise dos dados, não houve diferença entre os crioprotetores Glicerol e DMSO ($p=0.6114$) na sobrevivência espermática para as massas espermáticas, durante o tempo de armazenamento em N₂L (30, 60, e 90 dias), bem como para sobrevivência espermática quando analisada a interação tempo x crioprotetor ($p=0.5084$), permitindo o agrupamento dos dados. Quando analisada a sobrevivência ao longo do tempo, pôde-se perceber uma queda na sobrevivência espermática à medida que o tempo de estocagem aumentou de 30 para 90 dias ($p=0.0000$), sendo esse padrão decrescente demonstrado pela inclinação da linha de tendência dessas massas espermáticas (Figura 4).

No tempo zero (0) considerado a contagem a fresco (grupo controle), a sobrevivência espermática foi superior em relação às massas espermáticas criopreservadas em Glicerol e DMSO.

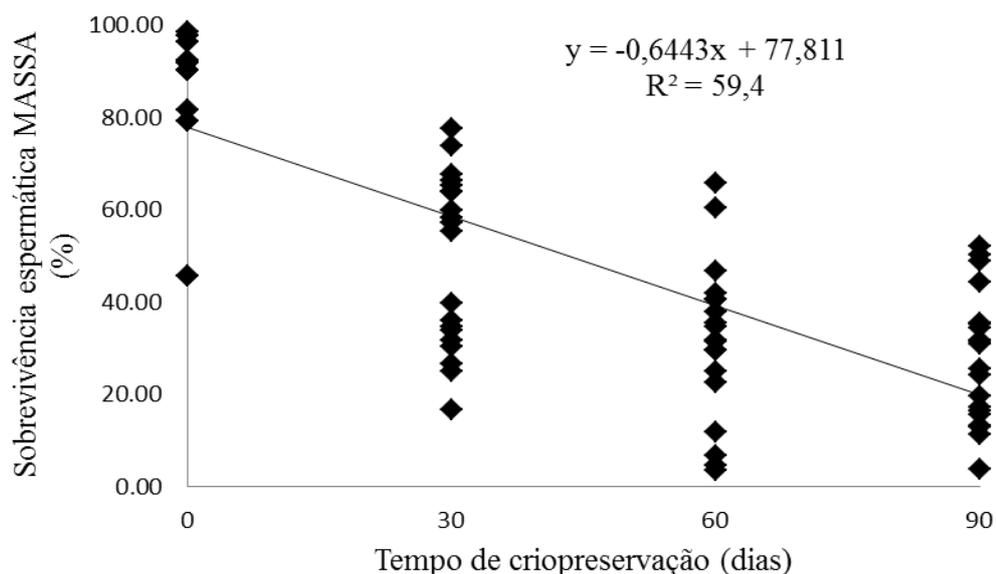


Figura 4. Sobrevivência espermática das massas criopreservadas por 30, 60 e 90 dias utilizando como crioprotetores o Glicerol e DMSO, armazenadas em nitrogênio líquido.

Com relação aos espermatozoides criopreservados, foram observadas diferenças não somente entre os crioprotetores ($p=0.0043$), bem como entre os tempos testados na sobrevivência espermática ($p=0.0248$) (Figura 5). Porém, não houve interação entre os crioprotetores e o tempo ($p=0.7779$). Assim como observado para a massa espermática, a sobrevivência dos espermatozoides decresceu em relação ao tempo de estocagem ($p=0.0000$) (Figura 5).

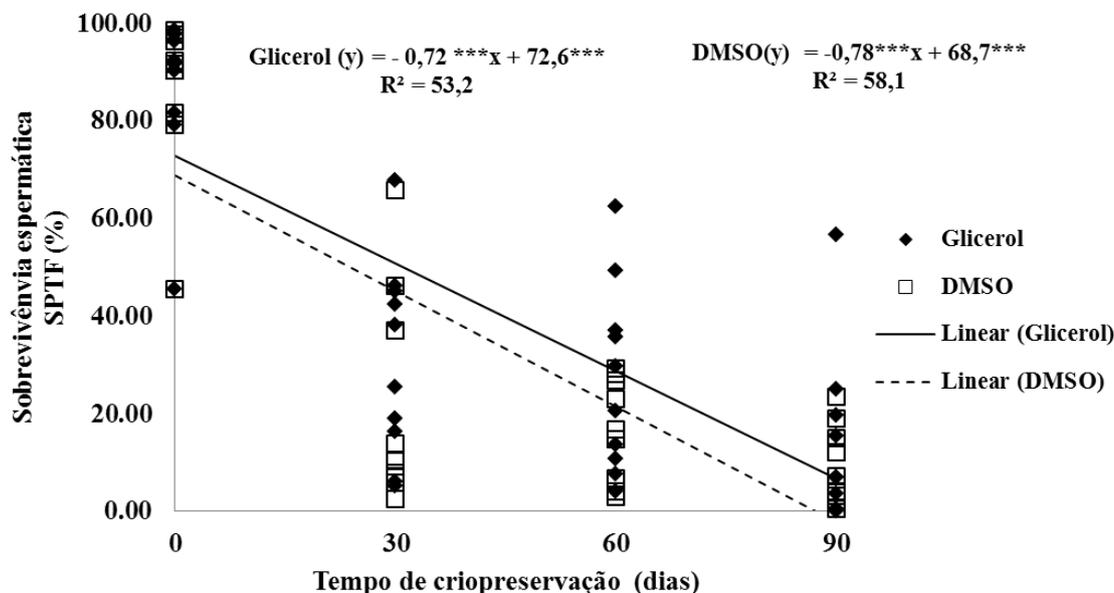


Figura 5. Sobrevivência espermática dos espermatozoides (SPTF) criopreservados por 30, 60 e 90 dias, utilizando como crioprotetores o Glicerol e o DMSO armazenados em nitrogênio líquido.

Os espermátóforos criopreservados em Glicerol apresentaram maior sobrevivência espermática ao longo do tempo quando comparados aos criopreservados em DMSO ($p=0.0002$) (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios e desvios padrões da sobrevivência espermática das massas espermáticas e espermátóforos criopreservados por 30, 60 e 90 dias em Glicerol e DMSO (10%).

Sobrevivência Espermática Média (%)			
Dias	30	60	90
MASSA			
Glicerol (10%)	53,98 ± 16,98 ^a	29,81 ± 15,83 ^b	26,56 ± 16,30 ^b
DMSO (10%)	44,40 ± 17,95 ^a	30,21 ± 19,10 ^a	28,86 ± 10,68 ^a
SPTF			
Glicerol (10%)	31,18 ± 19,11 ^a	27,15 ± 18,21 ^{ab}	13,52 ± 16,59 ^b
DMSO (10%)	20,74 ± 20,25 ^a	15,29 ± 10,67 ^a	8,92 ± 7,96 ^a

Os valores assinalados com letras iguais, não denotam diferenças significativas ($P<0,05$).

A sobrevivência média dos espermatozoides das massas espermáticas e espermátóforos criopreservados em Glicerol e DMSO a 10% encontra-se na Figura 6.

Observa-se que a sobrevivência espermática das massas criopreservadas em Glicerol (10%) foi superior em relação aos demais tempos (60 dias; $p=0.0113$; 90 dias $p=0.0040$), porém não foi observada diferença significativa entre 60 e 90 dias ($p=0.5963$). Não foram encontradas diferenças na sobrevivência das massas espermáticas durante o período de criopreservação em DMSO (10%) (30 dias; $p=0.1728$; 60 dias; $p=0.1255$; 90 dias; $p=0.2474$).

A sobrevivência espermática dos espermátóforos criopreservados em Glicerol (10%) foi superior no período de 30 dias quando comparada com 90 dias em N_2L ($p=0.0451$). Entretanto, quando foram criopreservados em DMSO (10%) não houve diferença significativa na sobrevivência durante os períodos de manutenção em N_2L ($p=0.0992$).

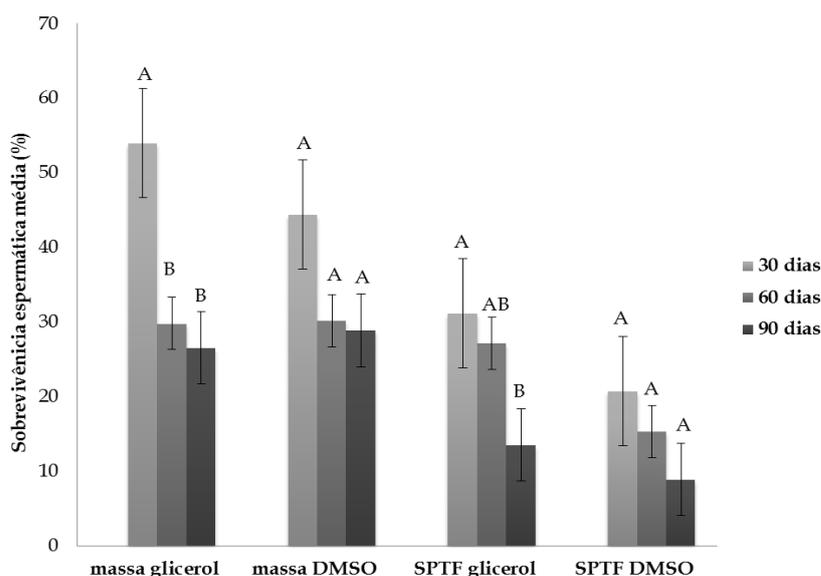


Figura 6. Porcentagem média de sobrevivência espermática das massas espermáticas e dos espermátóforos criopreservados em glicerol e DMSO a 10% por 30, 60 e 90 dias.

Os valores assinalados com letras iguais, não denotam diferenças significativas ($P<0,05$).

4 DISCUSSÃO

A avaliação dos espermatozoides maduros em crustáceos é mais complexa que em vertebrados, por não apresentarem motilidade, portanto, sua avaliação por meio dos batimentos do flagelo é impossível. De acordo com Wang et al. (1995), a contagem dos espermatozoides e suas avaliações macroscópicas são utilizadas para caracterizar o potencial reprodutivo em camarões Peneídeos.

A principal preocupação em relação aos espermatozoides que tenham sido submetidos a criopreservação é se estes apresentam qualidade, em termos de viabilidade quando comparados aos espermatozoides frescos. Embora a fertilização seja um critério final em que a qualidade dos espermatozoides descongelados pode ser avaliada, este método é pouco prático, uma vez que a maturação das fêmeas em cativeiro torna-se difícil para a espécie *L. schmitti*.

A viabilidade espermática do presente estudo reduziu com o aumento do tempo de permanência tanto do espermatóforo quanto da massa espermática em N₂L, este resultado pode indicar a influência do tempo na queda do metabolismo dos espermatozoides. Várias suposições podem ser inferidas como a perda de proteínas, lipídeos ou carboidratos durante a manutenção das amostras em N₂L, como foi observado por Yoo et al. (1987) quando verificou a perda de proteínas pela membranas celulares dos espermatozoides do fluido seminal criopreservados de salmão, assim como Jeyalectume e Subramoniam (1989) observaram o declínio de carboidratos e proteínas em *S. serrata* a -4°C. Observou-se no primeiro capítulo do presente estudo, a presença de polissacarídeos e proteínas nos espermatozoides, na secreção do vaso deferente médio e ampola terminal de *L. schmitti*, podendo inferir a possibilidade do declínio de polissacarídeos nos espermatozoides criopreservados, o que indicaria a atividade metabólica utilizando os carboidratos como fonte de energia durante a manutenção destes em N₂L, o que justificaria a queda na sobrevivência espermática ao longo do tempo.

Os resultados deste estudo mostraram que a taxa de congelamento é um fator crítico na criopreservação do espermatozoide de *L. schmitti*, sendo o mesmo observado por Lezcano et al. (2004) para *Litopenaeus vannamei*.

O protocolo B, utilizado no presente estudo, que obteve a menor sobrevivência, provavelmente ocorreu devido às crioinjúrias causadas pela formação de cristais de gelo intracelular (não houve neste caso a desidratação adequada da célula durante o processo de congelamento), originada pelo congelamento rápido, além da indução de alterações severas no citoesqueleto, tornando a membrana celular mais sensível às mudanças osmóticas.

Bart et al. (2006) congelaram espermatóforos de *Penaeus monodon* em duas etapas: a primeira a temperatura baixou 15°C/min até alcançar -10°C, posteriormente a queda da mesma foi de 2°C/min, diminuindo de -10°C a -80°C e finalmente os espermatóforos foram imersos em N₂L, permanecendo criopreservados por 48h. Estes autores utilizaram como agentes crioprotetores DMSO, metanol e etilenoglicol nas concentrações de 5 e 10%. O melhor resultado foi observado com DMSO a 5% obtendo 79,7% de sobrevivência espermática. A medida que aumentaram a concentração dos crioprotetores para 10%, a sobrevivência espermática foi reduzida. Portanto, a sobrevivência elevada dos espermatozoides provavelmente foi devido ao reduzido tempo de exposição dos espermatóforos em N₂L o que torna difícil a comparação com os resultados obtidos no presente estudo.

Ao trabalharem com duas velocidades de congelamento (rápida e lenta), Lezcano et al. (2004) verificaram que mais de 98% das células espermáticas de *L. vannamei* foram destruídas quando submetidas à diminuição da temperatura de 10°C/min. No entanto, quando a velocidade da queda da temperatura foi superior a 5°C/min, as células espermáticas descongeladas em *S. ingentis* foram danificadas (ANCHORDOGUY et al., 1988), concordando com o presente estudo para o protocolo B. Estes autores relatam que a queda da sobrevivência espermática em função da velocidade de congelamento (*fast freezing*) se deve à ruptura da membrana celular, ao contrário do que ocorre com a baixa taxa de congelamento (*slow-freezing*). Chow et al. (1985) também relataram a influência negativa do resfriamento rápido sobre a viabilidade do espermatozoide em *M. rosenbergii*.

O congelamento lento foi bem sucedido com outras espécies de decápodos, como para sêmen de *Litopenaeus vannamei* (LEZCANO et al., 2004), *Sicyonia ingentis* (ANCHORDOGUY et al., 1988), com espermatóforos de *Macrobrachium rosenbergii* (CHOW et al., 1985 e AKARASANON et al., 2004) e *Scylla serrata* (JEYALECTUMIE e SUBRAMONIAN, 1989); concordando com os resultados do presente estudo para o protocolo A, em que a velocidade da queda de temperatura foi de 5°C/min até atingir -32°C.

Jeyalectumie e Subramonian (1989) ao criopreservarem espermatóforos de *S. serrata* a -196°C, -79°C e -4°C por até 30 dias obtiveram até 95% de sobrevivência espermática em Glicerol e 89% para o DMSO, corroborando com o presente estudo, no qual experimentos com Glicerol apresentaram maior sobrevivência espermática (31,18%) em relação ao DMSO (20,74%). Embora Parks e Graham (1992) tenham sugerido que o Glicerol interfere na extremidade hidrofílica dos fosfolípidos das membranas celulares conduzindo ao dano das mesmas, esta informação não está de acordo com os resultados encontrados no presente estudo em que o Glicerol mostrou ser o melhor agente crioprotetor para o espermatóforo, quando comparado ao DMSO.

Lezcano et al. (2004) criopreservaram por 2-3 dias espermatóforos, massa espermática e a suspensão espermática em DMSO, metanol, glicerol e etilenoglicol a 10% em duas curvas (rápida e lenta). Os autores observaram uma variação na taxa de sobrevivência espermática de acordo com o crioprotetor e o tipo de material criopreservado. A melhor sobrevivência foi obtida com a massa espermática, utilizando metanol e etilenoglicol a 10%, com 45% e 27% de células normais (presença de espinho) respectivamente, no congelamento lento de 0,5°C/min. Esses autores observaram a menor taxa de sobrevivência para o Glicerol (~25%) e DMSO (~32%). Para os espermatóforos, os autores verificaram a sobrevivência de aproximadamente 11% em Glicerol e 15% em DMSO. Contrariamente, no presente estudo, foram encontrados resultados superiores, sendo a sobrevivência para as massas espermáticas criopreservadas em Glicerol de 53,98%, em 30 dias de manutenção em N₂L, e 44,40% em DMSO (protocolo A). Para os espermatóforos criopreservados por 30 dias a sobrevivência foi 31,18% em Glicerol e 20,74% em DMSO.

As diferentes taxas de sobrevivência obtidas para a massa espermática e o espermatóforo, podem ser explicadas pela utilização de distintas metodologias de descongelamento, entretanto, Salazar et al. (2008) relataram que a parede do espermatóforo pode servir de barreira, prevenindo o efeito do crioprotetor sobre a célula. Tal inferência corrobora com os resultados do presente estudo, uma vez que se verificou menor sobrevivência espermática dos espermatóforos em relação às massas espermáticas criopreservadas. Outro fato que pode ser levado em consideração é que o material adesivo que envolve os espermatozoides das massas espermáticas pode contribuir para a proteção contra os danos do congelamento e para a mudança da osmolaridade nas mesmas.

Salazar et al. (2008) utilizando protocolo semelhante ao do presente estudo (protocolo A) criopreservaram massa espermática por um período de 72 h, utilizando-se metanol 10% e obtiveram maior sobrevivência (60%) em relação aos espermatóforos (~25%). Estes

resultados foram semelhantes ao do presente estudo, porém utilizando-se o Glicerol e o DMSO a 10% no período de 30 dias.

Anchordoguy et al. (1988) estudando a toxicidade de diferentes crioprotetores observaram a superioridade para o DMSO (5%) em relação aos demais crioprotetores utilizados (Glicerol, Sacarose, Prolina e Trealose). Tal resultado difere do presente estudo com *L. schmitti*, devido à ausência de diferenças entre os crioprotetores (Glicerol e DMSO a 10%) para a massa espermática, porém corrobora com Gwo (2000), afirmando que a escolha do crioprotetor depende da espécie de crustáceo.

Leena Grace e Natarajan (2003) verificaram que a combinação dos crioprotetores glicose, glicerol, DMSO e metanol para a criopreservação do sêmen de *P. monodon* por 30 dias resultou em 92,3% de sobrevivência espermática para glicose/metanol (considerada superior) e 86,5% (considerada bom) para o glicerol isoladamente; já para o DMSO foi considerado moderado. No presente estudo não houve diferença na sobrevivência da massa espermática criopreservada em Glicerol e DMSO, diferindo dos referidos autores.

Vuthiphandchai et al. (2007) também testaram um protocolo de criopreservação de espermatóforos de *P. monodon* e três métodos de descongelamento. Dentre os agentes crioprotetores testados (DMSO, etilenoglicol, propilenoglicol, formamida e metanol nas concentrações 5, 10, 15 e 20%), o DMSO a 5% foi o que apresentou o melhor resultado no teste de toxicidade. Esses autores, posteriormente avaliaram diferentes velocidades de queda da temperatura e observaram a melhor sobrevivência espermática com a menor velocidade de queda da temperatura, confirmando os resultados do presente estudo para o protocolo A em que a temperatura final foi de -32°C e a mesma velocidade de queda da temperatura. Os autores mantiveram os espermatóforos por 210 dias em N₂L e verificaram queda na sobrevivência a partir de 60 dias (87,3%) e 90 dias (53,3%), confirmando os resultados do presente estudo. Embora os resultados de viabilidade desses autores sejam superiores em relação ao atual estudo, também houve o efeito negativo do tempo sobre a sobrevivência espermática.

Segundo Montoya (2001) ocorre uma redução da qualidade dos espermatóforos em *Litopenaeus setiferus*, *L. stylirostris* e *L. vannamei*, quando os mesmos estão em cativeiro, influenciando na qualidade espermática em machos maduros. Estas observações são importantes para a continuidade dos esforços em relação à criopreservação, uma vez que, por meio desta biotecnologia, a preservação tanto do espermatóforo quanto da massa espermática poderia beneficiar não somente a conservação dos estoques genéticos masculinos, mas também as aplicações em avanços tecnológicos, como por exemplo, a manipulação genética, o que beneficiaria tanto a preservação da espécie como a aquicultura.

Assim como no presente estudo, Bray e Lawrence (1998) não observaram diferença na morfologia dos espermatozoides (contagem espermática e células anormais) de *L. vannamei* quando mantiveram o vaso deferente e a ampola terminal a 15°C por 36h demonstrando a possibilidade de utilização de animais *post mortem*.

Como visto anteriormente, os crioprotetores podem ser utilizados isoladamente ou em combinação, portanto, sugere-se a inclusão de crioprotetores extracelulares (gema de ovo, leite, sacarose ou trealose), que já estão sendo usados em mamíferos e em alguns trabalhos com crustáceos, na tentativa de melhorar a sobrevivência espermática após a criopreservação. Além dos crioprotetores internos e externos, outros fatores como taxa de congelamento, temperatura de descongelamento podem melhorar e/ou otimizar os resultados aqui descritos.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Os camarões *L. schmitti post mortem* apresentaram espermatozoides típicos de Peneídeos, os quais são produzidos ao longo do ano, porém a atividade espermatogênica é maior durante o período reprodutivo (verão).

As secreções glicoproteicas encontradas a partir da região média do vaso deferente, mantém a viabilidade morfológica dos espermatozoides *post-mortem* a baixas temperaturas. Desta maneira, além da estrutura do espermatóforo, estas secreções tem função de proteção e nutrição dos espermatozoides maduros.

Por meio das análises histológicas e ultraestruturais das secreções do vaso deferente e da ampola terminal de animais *post mortem* constatou-se, que é possível a utilização dos espermatóforos destes machos para a criopreservação, conforme resultados satisfatórios encontrados para o protocolo A.

Tanto o Glicerol como o DMSO podem ser utilizados na criopreservação da massa espermática, entretanto para a criopreservação do espermatóforo, sugere-se a utilização do Glicerol a 10%.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, verifica-se a necessidade de maiores estudos para avaliar a viabilidade dos espermatozoides de camarões *post mortem*, uma vez que ficou comprovado que os mesmos podem ser utilizados para criopreservação. Estes resultados poderão extrapolar do campo da pesquisa para as atividades comerciais, viabilizando maior aproveitamento dos machos em cativeiro e menor custo, como por exemplo, a utilização de machos *post mortem* comprovadamente livres de patógenos.

O uso de espermatozoides de animais *post mortem* constitui uma nova alternativa para o emprego da criopreservação e utilização futura do material genético.

A queda da sobrevivência espermática ao longo do tempo, também sugere a necessidade de mais estudos para a compreensão deste evento, seja por meio de estudos bioquímicos ou microscopia de fluorescência de espermatozoides descongelados, avaliando quais os componentes dos espermatozoides, que podem estar reduzindo durante a permanência em N₂L.

A dificuldade de maturar fêmeas de *L. schmitti* em laboratório, não possibilitou a confirmação do protocolo (congelamento/descongelamento) mediante a inseminação artificial, assim como dos crioprotetores e suas concentrações, portanto mais pesquisas devem ser realizadas focando a maturação destes animais em cativeiro.

Os crioprotetores associados a outros componentes também devem ser testados, em uma expectativa de melhora da viabilidade espermática.

Todas as informações relacionadas à criopreservação de camarões são baseadas em espécies exóticas, tanto marinhas quanto de água doce, portanto, mais estudos são necessários com as espécies nativas, em especial para *L. schmitti*, dada a sua importância econômica.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- ALMEIDA, J.L. Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen eqüino. **Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)**. Universidade de Brasília. 2006. 90p.
- ANCHORDOGUY T.; CROWE J.H.; GRIFFIN F.J; CLARK, W.H. Cryopreservation of sperm from the marine shrimp *Sicyonia ingentis*. **Cryobiology**, v.25, p. 238–43, 1988.
- ARCE, S.M.; MOSS, S.M.; ARGUE, B.J. Artificial insemination and spawning of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*: implications for a selective breeding program. **UJNR Technical Report**, n. 28, p. 5-8, 1999.
- BART, A.N.; CHOOSUK, S.; THAKUR, D.P. Spermatophore cryopreservation and artificial insemination of black tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). **Aquaculture Research**, v. 37, p. 523-528, 2006.
- BEHLMER, S.D.; BROWN, G. Viability of cryopreserved spermatozoa of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus* L. **International Journal Invertebrate Reproduction Development**, v.7, p. 193-199, 1984.
- BRAVANISHANKAR, S. e SUBRAMONIAM, T. Cryopreservation of spermatozoa of the edible mud crab *Scylla serrata* (Forskål). **Journal of Experimental Zoology**, v. 277, p. 326-336, 1997.
- CASTELO-BRANCO, T. Avaliação de técnicas de criopreservação de sêmen do camarão branco, *Litopenaeus schmitti* (Crustacea, Dendrobranchiata, Penaeidae). **Dissertação (Mestrado em Ciências)**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2010. 42p.
- CHOW, S.; TAKI, Y.; OGASAWARA, Y. Cryopreservation of spermatophore of the fresh water shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*. **The Biological Bulletin**, v.168, p. 471–5, 1985.
- ELMOAZZEN, H. Y. Parameters affecting water permeability across biological cell membranes. 2000. **Dissertation (Master of Science)**. University of Alberta, Edmonton. 141p.
- FABBRI, R. Cryopreservation of human oocytes and ovarian tissue. **Cell and Tissue Banking**, v. 7, p. 113-122, 2006.
- FRIEDLER, S.; GIUDICE, S. C.; LAMB, E. J. Cryopreservation of embryos and ova. **Fertility and Sterility**, v. 49, p. 743-764, 1988.

GONÇALVES, P.B.D; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2^a Ed. Roca, 2008, 395p.

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

HOVATTA, O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. **Reproductive Bio Medicine Online**, v.10, p. 729-734, 2005.

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

KARLSSON, J. O. M.; CRAVALHO, E. G.; TONER, M. Intracellular ice formation: causes and consequences. **CryoLetters**, v. 14, p. 323-336, 1993.

LEENA GRACE, B. e NATARAJAN, P. Cryopreservation of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) spermatozoa. **Indian Journal of Fisheries**, v. 50, n.3, p. 415-419, 2003.

LEIBO, S. P. Sources of variation in cryopreservation. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. Cryopreservation in aquatic species, Baton Rouge: **World Aquaculture Society**, 2000, p.75-83.

LEZCANO, M; GRANJA, C.; SALAZAR, M. The use of flowcytometry in the evaluation of cell viability of cryopreserved sperm of the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Cryobiology**, v. 48, p. 349–56, 2004.

MAZUR, P.; RALL, W. F.; LEIBO, S. P. Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova. Influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability. **Cell Biophysics**, v. 6, p. 197-213, 1984.

MEMON, A.J.; TALPUR, A.D.; KHAN, M.I.; FARIDDUDIN, M.O.; SAFIAH, J. Optimization of spermatophores cryopreservation protocolo of banana shrimp (*Penaeus merguensis*) (De Man, 1888). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.11, n.10, p.1688-1704, 2012.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. Ed. Sulina. v.2, 1982, 783p.

MONTOYA, J.M. **Controlled reproduction of penaeid shrimp: a contribution to its improvment**. 2001,149p.

MORRIS, G.I. **Cryopreservation: An introduction to cryopreservation in culture collections**. Ed. Institute of Terrestrial Ecology, Cambridge, 1981, 27p.

NIMRAT, S.; SIRIBOONLAMOM, S.; ZHANG, S.; XU, Y.; VUTHIPHANDCHAI, V. Chilled storage of white shrimp (*L. vannamei*) spermatophores. **Aquaculture**, n. 261, p.944–951, 2006.

PARKS, J.E. e GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p.209-222, 1992.

PÉREZ-JAR, L. Fisiología y calidad reproductiva de machos de camarón blanco *Litopenaeus schmitti* en condiciones de cautiverio. 2005. 150p. **Tesis (Doctorado en Ciencias)**. Centro de investigaciones biológicas del Noroeste, La Paz.

RESENDE, E. K. de.; MARQUES, D.K.S. **Criopreservação de sêmen de peixe**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2009. 5 p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 84). Disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/download.php?arq_pdf=CT84>. Acesso em: 02 fev 2012.

SALAZAR, M.; LEZCANO, M.; GRANJA, C. 2008. Protocol for cryopreservation of *Penaeus vannamei* sperm cells. In: CABRITA, E.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, P. *Methods in Reproductive Aquaculture. Marine and Freshwater Species*. Boca raton, FL, CRC Press, p.505-508.

SHAW, J. M. In: A. Trounson, D. Gardner. *In Vitro Fertilization*. Florida: CRC Press, Boca Raton, 1993. Chap.11.

SHAW, J.M.; WOOD, E.C.; TROUNSON, A.O. Cryopreservation of oocyte and embryo. In: TROUNSON A. e GARDNER D. **Handbook of In vitro fertilization**. 2^a ed. Florida: CRC Press, p.376-380, 2000.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VICOSA - UFV. **SAEG: Sistema de análises estatísticas e genéticas**. Versão 9.1. Viçosa, MG: 2007. 150p.

VUTHIPHANDCHAI, V.; NIMRAT, S.; KOTCHARAT S.; BART, 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, 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.

YOO, B.Y.; RYAN, M.A.; WIGGS, A.J. Loss of protein from spermatozoa of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) because of cryopreservation. **Canadian Journal of Zoology**, v.65, p. 9-13, 1987.