

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

DISSERTAÇÃO

**Avaliação de técnicas de criopreservação de sêmen
do camarão branco, *Litopenaeus schmitti*
(Crustacea, Dendrobranchiata, Penaeidae)**

THAÍS CASTELO BRANCO CHAVES

2010



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

**AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN
DO CAMARÃO BRANCO, *LITOPENAEUS SCHMITTI* (CRUSTACEA,
DENDROBRANCHIATA, PENAEIDAE)**

THAÍS CASTELO BRANCO CHAVES

Sob a Orientação da Professora
Dra. Lidia Miyako Yoshii Oshiro

e Co-orientação do Professor
Dr. Marco Roberto Bourg de Mello

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de pós-graduação em Zootecnia, Área de Concentração Produção animal.

Seropédica, RJ
Abril de 2010

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

THAÍS CASTELO BRANCO CHAVES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de pós-graduação em Zootecnia, área de Concentração em Produção animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM ____/____/____.

Dr^a. Lidia Miyako Yoshii Oshiro – UFRRJ
Orientadora

Dr. Silvio Peixoto

Dr^a. Roberta Soares

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais **Kácia Castelo Branco Chaves** e **Luiz Carlos Chaves** por ser meu porto seguro e por todo amor e ensinamentos que me permitiram chegar até aqui. A minha irmã **Talita** pelo carinho e amizade de todos os dias. Ao meu amor e grande incentivador **Frédéric Bordier**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **DEUS** por todas as metas que alcancei, e por me dar força e saúde para a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus pais **KÁCIA** e **LUIZ CARLOS**, e minha irmã **TALITA** que sempre me apoiaram em todos os momentos difíceis, e que compreenderam minhas longas e freqüentes ausências nas atividades da família para a realização dos meus experimentos.

Ao meu amor **FRÉDÉRIC** que sempre esteve presente, e mesmo quando distante, me estimulou, apoiando meus estudos, ajudando no experimento e entendendo minhas ausências.

A toda minha família que torce pelo meu sucesso e está sempre disposta a ajudar, muito bem representada pela vovó **ELYDIA**, minha torcedora “número um”. Agradeço em especial à tia **SILVANA**, funcionária do Instituto de Agronomia, que colaborou muito na aquisição dos materiais de laboratório que me permitiram iniciar os experimentos.

A minha orientadora professora **LIDIA MIYAKO YOSHII OSHIRO** pela amizade, ensinamentos, mas antes de tudo pela confiança depositada em mim antes mesmo de me conhecer. Obrigada professora, pela oportunidade!

Ao meu co-orientador professor **MARCO ROBERTO BOURG DE MELLO** pela orientação, ajuda no planejamento dos trabalhos e na realização do mesmo, além de estar sempre à disposição para colaborar e enriquecer este projeto.

Ao professor **MIRTON MORENZ** do corpo docente do PPGZ pela colaboração nas análises estatísticas e pela amizade e carinho.

Aos membros da banca professora **ROBERTA SOARES** e professor **SILVIO PEIXOTO** pela colaboração no enriquecimento do trabalho.

A minha grande amiga e parceira de experimento, **ANDREA BAMBOZZI**. Não tenho como agradecer toda a ajuda e presença constante em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis, tomando conta dos meus “filhinhos camarões” como se fossem dela. Muito obrigada por todo o carinho “abiga”, de todo coração!

Às amigas, **ANGÉLICA**, **HELAINÉ** e **MICHELLE** do corpo discente do PPGZ, pelos animados cafés da tarde, pela companhia e por todos os aprendizados que alcançamos juntas!

Aos colegas do corpo discente do PPGZ **EDUARDO**, **ELIZABETH** e **ARLEY** e a amiga zootecnista **GEOVANA**, pela realização das análises do alimento dos camarões.

Aos meus queridos amigos, estagiários da EBM **ANA PAULA**, **FELIPE**, **RÉGIS** e **GEOVANA** que foram peças fundamentais na realização deste trabalho, sempre trabalhando com alegria, dedicação e carinho. Foram dias cansativos, mas também muito divertidos ao lado de vocês, obrigada!

Ao funcionário aposentado da EBM-UFRRJ sr. **CASEMIRO** e aos funcionários da EBM-UFRRJ sr. **JOSEQUIAS** e sr.^a. **CRISTIANE** sempre simpáticos e prestativos, dispostos a ajudar a qualquer hora ou dia. Foram boa companhia nos momentos solitários na EBM, além do carinho e amizade.

A todos aqueles não mencionados que direta ou indiretamente colaboraram para o sucesso de mais uma etapa na minha vida. Obrigada!

RESUMO

CHAVES, Thaís Castelo Branco. **Avaliação de técnicas de criopreservação de sêmen do camarão branco, *Litopenaeus schmitti* (Crustacea, Dendrobranchiata, Penaeidae).** 2010. 33 págs. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Departamento de Produção Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

O camarão branco *L. schmitti* é considerado como uma das espécies mais promissoras para aqüicultura no Brasil. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar técnicas de criopreservação do sêmen de *L. schmitti*, utilizando dois agentes crioprotetores, Glicerol e DMSO e a influência do tempo de congelamento sobre a viabilidade espermática. O experimento foi dividido em duas fases experimentais onde, na primeira fase o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com dois crioprotetores (Glicerol e DMSO), duas concentrações (5 e 10%), e dois tempos de equilíbrio (10 e 30 minutos), com 4 repetições por tratamento. Na segunda fase o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com esquema de parcela subdividida, onde foram avaliadas duas diluições do Glicerol (5 e 10%) em três tempos de criopreservação (24 horas, 15 e 30 dias), e cada tratamento com 6 repetições. Os resultados do teste de toxicidade aos agentes crioprotetores não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos, Glicerol e DMSO nas duas concentrações e nem entre os dois tempos de equilíbrio testados, obtendo-se taxas de viabilidade espermática de até 97,42% após exposição aos mesmos. De acordo com os resultados da primeira fase e outras características favoráveis, o Glicerol foi selecionado como agente crioprotetor para a segunda fase experimental. Os resultados da segunda fase não indicaram diferença significativa entre as concentrações do Glicerol a 5 e 10%, não havendo influência sobre a viabilidade espermática ao longo dos 30 dias de criopreservação. Entretanto, observou-se diferença significativa para a sobrevivência ao longo do tempo de manutenção em nitrogênio, onde observou-se uma média de sobrevivência de 50,7% com 24 horas, 42,78% após 15 dias e 16,26% após 30 dias de criopreservação. Portanto, os crioprotetores Glicerol e DMSO a 5 e 10 %, nos tempos de exposição de 10 e 30 minutos, não demonstraram serem tóxicos aos espermatozóides de *Litopenaeus schmitti*. No entanto, o tempo de estocagem da massa espermática reduziu significativamente a viabilidade dos espermatozóides entre o 15º e o 30º dia de criopreservação em nitrogênio líquido. Esse resultado se deve às oscilações verificadas na velocidade de resfriamento ($0,5^{\circ}\text{C. Min}^{-1}$), que possivelmente influenciou a alta mortalidade das células espermáticas, observada nesta fase experimental. Assim, este resultado sugere a necessidade de repetir essa segunda fase experimental, bem como a utilização de outro equipamento de congelação gradual para comparação.

Palavras-chave: Agentes Crioprotetores, Camarão Marinho, Congelação, Glicerol, DMSO, Espermatozóide.

ABSTRACT

CHAVES, Thaís Castelo Branco. **Evaluation of techniques for cryopreservation of white shrimp, *Litopenaeus schmitti* (Crustacea, Dendrobranchiata, Penaeidae)**. 2010. 33 pp. Dissertation (Master Science in Animal Science). Instituto de Zootecnia, Departamento de Produção Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

The white shrimp *L. schmitti* is regarded as one of the most promising species for aquaculture in Brazil. This study was to evaluate techniques for sperm cryopreservation of *L. schmitti*, using two cryoprotectants, glycerol and DMSO and the influence of time of freezing on sperm viability. The experiment was divided into two phases where, in the first phase experiment was conducted on a randomly designed with two cryoprotectants (Glycerol and DMSO), two concentrations (5 and 10%), and two balance periods (10 and 30 minutes) with 4 replicates. In the second phase, the experiment was conducted in completely randomized design with a split plot design, evaluating two dilutions of glycerol (5 and 10%) in three periods of cryopreservation (24 hours, 15 and 30 days), and each treatment with 6 replicates. The results of the toxicity test to cryoprotective agents showed no significant difference between treatments in both Glycerol and DMSO concentrations, nor between the two balance periods tested, getting rates of sperm viability up to 97.42% after exposure to them. According to the results of the first stage and other favorable characteristics, the Glycerol was selected as cryoprotectant agent for the second phase. The results of the second phase indicated no significant difference between the concentrations of Glycerol at 5 and 10%, with no effect on sperm viability over the 30 days of cryopreservation. However, there was significant difference in survival over time for maintenance in nitrogen, where we observed a survival average of 50.7% at 24 hours, 42.78% after 15 days and 16.26% after 30 days of cryopreservation. Therefore, the cryoprotectants Glycerol and DMSO at 5 and 10% in exposure times of 10 and 30 minutes, not proved to be toxic to sperm of *Litopenaeus schmitti*. However, the storage time of the spermatic mass significantly reduced the viability of sperm between the 15th and 30th day of cryopreservation, in liquid nitrogen. This result is due to the oscillations observed in the cooling rate ($0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$), which probably influenced the high mortality of sperm cells, observed in this phase. Thus, this result suggests the need to repeat this second phase, and the use of another gradual freezing equipment for comparison.

Key words: Cryoprotectants, Marine Shrimp, Freezing, Glycerol, DMSO, Sperm.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Indivíduo macho maduro do camarão branco <i>Litopenaeus schmitti</i> , em detalhe espermatóforo maduro apresentando boas características externas.	32
Figura 2. Mapa da baía de Sepetiba, local da captura dos camarões próximo da pedreira de Muriquí (indicado com a seta vermelha).	33
Figura 3. (A) Caixa de polietileno onde foram acondicionados os camarões, contendo comedouro e aquecedor. (B) Instalações da Estação de Biologia Marinha.	33
Figura 4. Extração do espermatóforo do camarão branco <i>Litopenaeus schmitti</i> através da técnica de compressão abdominal.	34
Figura 5. Esfregaço em lâmina da massa espermática do camarão <i>Litopenaeus schmitti</i> , observado em microscópio óptico. A) células mortas; B) células vivas.	35
Figura 6. Tanque de armazenamento de sêmen em nitrogênio líquido (a esquerda) e equipamento de criopreservação de sêmen e embriões Cryogen da Neovet (a direita).	36
Figura 7. Viabilidade espermática do <i>Litopenaeus schmitti</i> após exposição em Glicerol e DMSO em duas concentrações, 5% e 10 %, e submetidos a dois tempos de equilíbrio, 10 e 30 minutos.	39
Figura 8. Percentual de sobrevivência espermática após criopreservação em Glicerol a 5% e 10% , e média dos tratamentos por 1, 15 e 30 dias.	44

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Composição da solução salina	34
Tabela 2. Composição bromatológica da ração INVE utilizada na alimentação dos machos reprodutores <i>L. schmitti</i> durante os experimentos.	37
Tabela 3. Proporção dos alimentos frescos utilizados na alimentação dos machos reprodutores <i>L. schmitti</i> durante os experimentos.	37
Tabela 4. Médias da viabilidade espermática do camarão <i>L. schmitti</i> estocados em Glicerol 5% e 10% por 24 horas, 15 e 30 dias.	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2.3	Aspectos da biologia reprodutiva dos Peneídeos e de <i>Litopenaeus schmitti</i> .	21
2.4	Criopreservação de sêmen	24
3.1	Localização e Grupos Experimentais	31
3.2	Primeira fase experimental	33
3.3	Segunda fase experimental	35
3.4	Análise estatística	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	Efeito da concentração dos crioprotetores DMSO e Glicerol e do tempo de equilíbrio sobre a viabilidade espermática.	39
4.2	Influência da concentração do Glicerol e do tempo de manutenção em nitrogênio líquido sobre a viabilidade espermática	43
5	CONCLUSÕES	49
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

O setor aquícola vem expandindo a cada ano em diversos países, tornando-se um fator de crescimento econômico importante na maioria deles. Segundo dados da FAO (2008), recentemente a captura de camarão no mundo alcançou cerca de 3,4 milhões de toneladas por ano, sendo a Ásia, a área de maior destaque para a pesca do camarão. E atualmente, a produção mundial do camarão, ambos capturados e cultivados, é de aproximadamente 6 milhões de toneladas, das quais cerca de 60% entra no mercado mundial. E ainda, em termos de valor na negociação internacional, o camarão é a commodity de pesca mais importante sendo que para muitos países tropicais em desenvolvimento, a exportação de produtos aquícolas é de grande importância econômica (FAO, 2008), além da perspectiva no aumento da geração de emprego, que também é bastante significativa.

As características da produção camaroneira no mundo variam muito entre países e segundo dados do IFREMER (2008), a Noruega é um país exclusivamente pesqueiro, já China, Indonésia e EUA são de maioria pesqueira (70-95%), mas apresentam alguma produção em cultivos. Já a Tailândia e o Brasil são classificados como países aquicultores, visto que obtêm, respectivamente, 64% e 68% da sua produção de camarão em cativeiro, enquanto o Equador é um país quase que exclusivamente aquícola, onde aproximadamente 95% do camarão é cultivado.

Atualmente, o camarão asiático *Litopenaeus vannamei*, espécie originalmente criada na costa do Pacífico, na região da América Latina é o camarão mais cultivado no mundo. Esta espécie representa agora mais da metade (57%) da produção mundial, superando o *Penaeus monodon* (29%) mais cultivado da Ásia (IFREMER, 2008).

No Brasil, a produção de camarões peneídeos em cativeiro é baseada na espécie exótica *L. vannamei*, que tem apresentado muitas vantagens produtivas em relação às espécies nativas ao longo dos anos. No entanto, a atividade pesqueira permanece ativa e acaba por exceder a capacidade de produção sustentável na maioria das áreas tradicionais de pesca em todo o Brasil.

O estado do Rio de Janeiro com uma produção de 82.528,5 t é o maior produtor de pescado da região Sudeste e registrou um crescimento de 23,3%, mas apresentou um decréscimo na pesca de crustáceos de 5,3% em 2007 (IBAMA, 2007). A pesca de camarão no estado do Rio de Janeiro é realizada de forma artesanal ou por frotas de embarcações a motor, que dispõem de redes de arrasto, que arrebatam animais de diversas espécies e tamanhos, o que torna a pesca extrativa ainda mais prejudicial à fauna marinha. No município

de Mangaratiba, estado do Rio de Janeiro, observa-se que os camarões peneídeos *Farfantepenaeus brasiliensis* e o *L. schmitti* são espécies frequentemente pescadas e exploradas, sendo comercializadas por restaurantes, mercados e peixarias tornando-se peças importantes para a economia local. Diversos pescadores da região de Mangaratiba e Ilha da Madeira, relatam uma redução brusca na população de camarões nos últimos anos, o que dificulta a pesca artesanal, e responsabilizam a forte presença de embarcações com tração motorizada que dominam a atividade pesqueira na região.

Segundo Kuruvilla et al. (2000), a pesca por arrasto é responsável pelo recolhimento de diversas espécies de camarões peneídeos ao longo da costa do Caribe e da América do Sul, e uma das principais delas é o *L. schmitti*, entretanto no Brasil não existem leis regulamentadas para o controle da pesca direcionados para esta espécie.

Na Instrução normativa nº 189, de 23 de setembro de 2008, o IBAMA determinou o período de defeso para a pesca do camarão sete barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) e sua fauna acompanhante. Desta forma é proibido o exercício da pesca de arrasto com tração motorizada para a captura das espécies *F. paulensis*, *F. brasiliensis*, *F. subtilis*, *X. kroyeri*, *L. schmitti*, *Pleoticus muelleri* e *Artemesia longinaris* no período de 1º de março a 31 de maio na divisa dos estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro e na Foz do Arroio Chuí, estado do Rio Grande do Sul, e no período de 15 de novembro a 15 de janeiro, para os estados da Bahia e Espírito Santo. Neste mesmo documento ficou permitida a pesca de camarão branco (*L. schmitti*), nas áreas e períodos anteriormente citados, desde que não seja realizada por arrasto com tração motorizada.

Observa-se então, que o incremento de tecnologias no setor pesqueiro vem permitindo a captura de volumes cada vez maiores de pescado, o que pode comprometer diretamente a estrutura populacional e renovação de estoques naturais de diversas espécies, o que torna necessário um investimento em biotecnologias de reprodução que otimizem a produção de pós-larvas das espécies nativas de peneídeos, possibilitando a produção em cativeiro e a reposição de estoques naturais destes animais.

A fim de otimizar o crescimento da indústria aquícola foi necessário investir em tecnologias de produção, manejo, reprodução e, mais recentemente, melhoramento genético das espécies com potencial produtivo. A criopreservação e estocagem de sêmen a longo prazo são técnicas importantes para a realização de diversos processos tais como hibridização, domesticação, conservação de populações e seleção genética, favorecendo assim programas de melhoramento genético em espécies de interesse econômico. Ademais, a congelação do sêmen em nitrogênio líquido garante estabilidade celular permitindo suprimento constante de

sêmen com pouca mão de obra e espaço reduzido, sem as limitações sazonais de reprodução e menor custo na manutenção de reprodutores, ao diminuir o número de machos reprodutores da criação (GWO, 2000).

Diante do reduzido número de estudos sobre biotecnologias de reprodução de Peneídeos, este trabalho tem como objetivo desenvolver as técnicas de criopreservação de espermátóforos da espécie nativa *L. schmitti*, que atualmente não está sendo cultivado comercialmente no Brasil. O desenvolvimento e utilização das técnicas possibilitarão a reprodução em cativeiro por inseminação artificial e permitirão a produção em massa destes camarões em épocas de pesca proibida (defeso) viabilizando a produção comercial da espécie o ano todo, bem como garantir a re-estocagem das populações naturais. Para tal serão avaliados dois agentes crioprotetores, Glicerol e DMSO em duas concentrações, 5 e 10 %, em diferentes tempos de equilíbrio, 10 e 30 minutos, onde serão selecionados os mais adequados para a estocagem da massa espermática através do teste de toxicidade dos mesmos em relação ao espermatozóide, e a influência do tempo de congelamento por 24 horas, 15 e 30 dias, sobre a viabilidade espermática.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação taxonômica do camarão branco *Litopenaeus schmitti* segundo Pérez Farfante e Kensley (1997).

Filo Arthropoda
Subfilo Crustacea
Classe Malacostraca
Subclasse Eumalacostraca
Superordem Eucarida
Ordem Decapoda
Subordem Dendobranchiata
Infraordem Penaeidea
Superfamília Penaeoidea
Família Penaeidae
Gênero *Litopenaeus*
Espécie *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936)

2.2 Distribuição geográfica do *Litopenaeus schmitti* e sua importância econômica.

O camarão peneídeo *L. schmitti*, vulgarmente conhecido como camarão branco, é uma espécie nativa com distribuição que se estende desde Belize ao longo da costa do Caribe, seguindo pela costa Atlântica da América do Sul até a região de Laguna, Estado de Santa Catarina, no sul do Brasil (PÉREZ-FARFANTE, 1970; JAR, 2005). Segundo Holthuis (1980), *L. schmitti* são estuarinos e marinhos encontrados em profundidades entre 2 e 47 metros, sendo mais abundante entre 15 e 30 metros, distribuindo-se em fundo lamoso ou de silte, podendo habitar algumas vezes fundo arenoso.

O camarão branco *L. schmitti* é considerado como uma das espécies mais promissoras para aqüicultura no Brasil e em criações extensivas com salinidade entre 20 a 45. Essa espécie atinge um tamanho maior que outras espécies nativas, além de ser uma espécie de importância econômica no Estado do Rio de Janeiro, no entanto não cultivada no Brasil.

Segundo Oshiro et al. (2005), o *L. schmitti* representa 38% dos camarões encontrados na Baía de Sepetiba, litoral do Rio de Janeiro, e este junto com o camarão rosa (*F. brasiliensis*) representa um dos principais recursos pesqueiros da região.

Das espécies de camarões que ocorrem na Baía de Sepetiba, somente *L. schmitti* realiza todo seu ciclo de vida dentro da Baía (SILVA, 1977). Esta espécie foi estudada em

relação à reprodução em cativeiro, ainda no final da década de 80 e início da década de 90 por Bueno (1989 e 1990) no Brasil; por Nascimento et al. (1991) no Texas; e por Ramos et al. (1995), Tizol et al. (1996) e Jar (2005) em Cuba. Entretanto, atualmente no Brasil desconhecem-se criações comerciais dessa espécie. Verifica-se portanto, que no país foram realizados estudos em relação ao cultivo de *L. schmitti* na década de 90, mas o cultivo comercial provavelmente foi pouco representativo e não obteve sucesso, devido às condições mais favoráveis e superiores apresentados por *L. vannamei*.

2.3 Aspectos da biologia reprodutiva dos Peneídeos e de *Litopenaeus schmitti*.

O dimorfismo sexual em camarões peneídeos é bem definido e a identificação de machos e fêmeas é possível através da simples observação da parte ventral do animal, entre o último par de apêndices torácicos e o primeiro par de apêndices abdominais.

As fêmeas apresentam um órgão especializado na recepção do espermatóforo no momento da cópula, que está localizado próximo ao quinto par de pereiópodos denominado télico. Este órgão nos permite classificar estas fêmeas de camarões peneídeos em dois tipos: fêmeas de télico fechado e fêmeas de télico aberto (BARBIERI JÚNIOR & OSTRENSKY NETO, 2002).

Fêmeas de télico fechado apresentam placas laterais, formando um receptáculo seminal onde o espermatóforo é depositado pelo macho, neste caso a cópula ocorre logo após a ecdise da fêmea quando o novo exoesqueleto ainda está se consolidando (BARBIERI JÚNIOR & OSTRENSKY NETO, 2002). As espécies *P. monodon*, *F. chinensis*, e as espécies nativas *L. subtilis*, *F. brasiliensis* e *F. paulensis* são exemplos de camarões peneídeos de télico fechado.

Em espécies de télico aberto, quando a fêmea não possui placas laterais cobrindo o télico, a cópula só ocorre no período pós-muda (BARBIERI JÚNIOR & OSTRENSKY NETO, 2002). Portanto o exoesqueleto deve estar totalmente consolidado permitindo a total aderência do espermatóforo, para que este não seja perdido. Os camarões peneídeos *L. vannamei*, *L. setiferus*, *L. stylirostris* e *L. schmitti* são exemplos de espécies de télico aberto.

O sistema reprodutor dos camarões peneídeos de télico aberto é uma unidade fisiológica complexa, com funções de controle hormonal da diferenciação sexual do macho, controle da produção espermática e, possivelmente, da liberação de feromônios. No entanto, a produção espermática tem recebido maior atenção nas aplicações práticas mais imediatas para a reprodução controlada de camarões (ALFARO-MONTOYA, 2010).

Segundo descrito por Guitart et al. (1985), o sistema reprodutor dos machos de *L. schmitti* apresenta externamente dois poros genitais ou gonoporos situados no abdômen, na base do quinto par de periópodos, local por onde são exteriorizados os espermatóforos no momento da cópula. Além disso, existe outra estrutura externa chamada petasma, que se localiza no primeiro par de pleópodos, próximo aos poros genitais, responsável pela transferência do espermatóforo para o téllico da fêmea.

Internamente, o sistema reprodutor dos machos apresenta um par de testículos, com oito pares de lóbulos, posicionados dorsalmente no cefalotórax envolvendo o hepatopâncreas. Partindo dos testículos estão os vasos deferentes, que apresentam-se como túbulos contorcidos subdivididos em quatro partes: porção proximal que é fina e estreita; porção medial que é mais espessa e apresenta uma dupla curvatura; porção distal representada por um tubo longo e estreito; e a porção terminal mais dilatada que forma um receptáculo, chamado ampôla terminal. Esta última região é a responsável pela finalização da formação e armazenamento do espermatóforo que é a estrutura de armazenamento dos espermatozóides, e desemboca no poro genital por onde ocorre sua exteriorização (GUITART et al., 1985).

O espermatóforo do camarão peneídeo é formado por duas placas quitinosas, que cobrem a massa espermática, que inicialmente estão separadas e posteriormente são unidas nos receptáculos terminais do macho no momento da exteriorização do espermatóforo. Esta estrutura é responsável pela fixação do espermatóforo no téllico da fêmea, ajudado por uma substância gelatinosa que o acompanha, quando são expulsos (PÉREZ-FARFANTE, 1975).

Alfaro-Montoya (1993) propôs um modelo para a maturação sexual dos machos de peneídeos baseado em três níveis independentes: maturação testicular, maturação dos vasos deferentes e síntese dos espermatóforos. A maturação testicular está atrelada ao início da produção das espermátides, que seguem aos vasos deferentes e estes quando totalmente desenvolvidos são responsáveis por completar o processo de maturação dos espermatozóides. Ao final ocorre a síntese dos espermatóforos nas ampôlas terminais. Este mesmo modelo foi sugerido anteriormente e corroborado por Ceballos-Vázquez et al. (2003), que o utilizaram para explicar suas observações na qualidade espermática de *L. vannamei*, cultivados em cativeiro.

Estudando o processo de espermiogênese e estrutura do espermatozóide de *Parapenaeus longirostris*, Medina (1994), relata a existência de uma grande variedade de morfologia dos espermatozóides, dentre os crustáceos decápodos, encontrando-se duas grandes categorias, de acordo com os diferentes padrões de organização celular (BROWN et al., 1977; TALBOT e SUMMERS, 1978), os espermatozóides uniestrelados e os

multiestrelados. Espermatozóides uniestrelados são típicos da ordem Dendrobranchiata e Pleocyemata da infraordem Caridea, e exibem um apêndice único, chamado “spike” ou espinho, que é uma extensão da estrutura acrossomal. Os espermatozóides multiestrelados dos Pleocyemata não carídeos mostram diversos apêndices, ou braços de origem nuclear ou citoplasmática (MEDINA, 1994).

Camarões peneídeos, portanto apresentam espermatozóides uniestrelados e o estudo da dinâmica hormonal e maturação gonádica dos machos vem apresentando avanços importantes para a reprodução em cativeiro, bem como produção de pós-larvas para fins comerciais e ecológicos.

2.4 Criopreservação de sêmen

Diante dos avanços nos estudos da criopreservação de sêmen dos vertebrados, em especial mamíferos, observa-se que estudos referentes a animais invertebrados vêm sendo realizados a pouco *tempo*, ganhando maior proporção na última década. Até então, trabalhos isolados, principalmente com espécies de origem asiática, foram os precursores desta linha de estudos, tais como Zell et al. (1979) e Chow et al. (1985), que testaram a congelação do sêmen de ostras *Crassostrea gigas* e do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii*, respectivamente. Estudos com peneídeos são igualmente escassos, principalmente ao que se refere às espécies nativas de camarões da América do Sul.

Segundo Salazar et al. (2008), um dos principais inconvenientes para a criopreservação de sêmen de peneídeos é a falta de métodos confiáveis para a determinação da viabilidade celular após o descongelamento. As células espermáticas de peneídeos são flageladas e sem motilidade, portanto não é possível utilizar a motilidade como indicador de viabilidade celular. Métodos de taxa de fertilização são difíceis de serem utilizados devido ao fato de que o acoplamento do espermatóforo e a desova, não são simultâneos e apesar de células descongeladas possam estar viáveis, elas devem manter-se aderidas à fêmea até o momento da desova. Portanto, a avaliação de viabilidade celular é feita principalmente pela análise do morfotipo sob microscopia óptica e de métodos colorimétricos como o azul de tripano (LEUNG-TRUJILLO e LAWRENCE, 1987; ROSAS et al., 1993; PASCUAL et al., 1998) e a coloração por eosina e nigrosina (JEYALACTUMIE e SUBRAMONIAM, 1989; NIMRAT et al., 2008), que vem sendo utilizados em diversos estudos apresentando bons resultados para determinação da sobrevivência e viabilidade espermática.

O sucesso limitado observado em reproduções de muitas espécies de peneídeos em cativeiro pode estar relacionado com problemas reprodutivos em machos (PÉREZ-JAR, 2005). Pois, grande parte destes estudos com camarões são direcionados às fêmeas, fazendo-se necessário o desenvolvimento de estudos referentes à produção de espermátóforos e à qualidade espermática.

Dentre os principais fatores que influenciam no desempenho reprodutivo de machos em cativeiro está o tempo de manutenção dos animais sob estas condições, o que colabora com a deteriorização do espermátóforo (LEUNG-TRUJILLO e LAWRENCE, 1987), além do peso e a idade dos machos reprodutores (CEBALLOS-VÁZQUEZ et al., 2003; PEIXOTO et al., 2004), podendo estar relacionados com a ocorrência de melanização do espermátóforo (MRSM) e/ou da síndrome degenerativa do trato reprodutivo do macho (MRTDS) e, conseqüentemente, o aumento da mortalidade das células espermáticas, que também influenciam na qualidade espermática.

A melanização do trato reprodutivo masculino, também conhecida por MRSM (male reproductive system melanization) e a síndrome degenerativa do trato reprodutivo do macho MRTDS (male reproductive tract degenerative syndrome) são síndromes caracterizadas pela redução progressiva no número de células espermáticas e um aumento no percentual de células anormais e mortas. A MRSM é provocada pela produção de melanina pelo sistema imune do camarão após infecção por bactérias quitinolíticas.

Segundo Pérez-Jar (2005), após dois meses de experimento, os machos de *L. schmitti* atingiram a exaustão reprodutiva devido a um aumento da temperatura da água, reduzindo o desempenho reprodutivo. A autora observou que esta diminuição foi mais acentuada no camarão selvagem, provavelmente por serem menos tolerantes ao cativeiro.

Pascual et al. (1998) estudando machos adultos de *Penaeus setiferus* expostos a temperaturas da água de 26°C e 30°C por até 30 dias, observaram que o controle da temperatura de cultivo, em especial para machos, foi de extrema importância, visto que a temperatura é um fator de grande influência na redução da qualidade do sêmen. E Perez-Velazquez et al. (2001) obtiveram resultados semelhantes ao estudar a influência da temperatura na qualidade espermática em *L. vannamei*, a 26°C, 29°C e 32°C por 42 dias, observando alto grau de deteriorização do espermátóforo ao final do experimento nas duas temperaturas mais altas, sugerindo a temperatura de 26°C como ideal para a manutenção em cativeiro de machos reprodutores desta espécie.

O método de extração do espermátóforo seja por eletroejaculação ou compressão abdominal pode influenciar na produção e qualidade espermática, além de permitir o

reaproveitamento do reprodutor. Rosas et al. (1993) avaliaram a perda de espermátóforos como um resultado do estresse causado pela captura e transporte, tornando-se um problema frequente, especialmente em espécies com tético aberto como *P. setiferus*, *P. tylirostris*, *L. schmitti* e *L. vannamei*. Estes mesmos autores sugeriram como solução deste problema, a prática da inseminação artificial, para desenvolver técnicas de retirada dos espermátóforos sem interferir na qualidade reprodutiva do animal. Neste mesmo trabalho, esses autores constataram que o camarão peneídeo *P. setiferus* não regenera facilmente após a eletroejaculação, sugerindo que o eletrochoque pode produzir características como MRTDS, na regeneração do espermátóforo.

Segundo Ramos et al. (1995), avaliando performances de fêmeas abladadas e não-abladadas copuladas com machos eletroejaculados ou não, do camarão branco *Litopenaeus schmitti*, números maiores de espermátóforos necróticos foram encontrados em machos eletroejaculados (23%) em relação aos que não foram eletricamente estimulados (4%). Neste mesmo estudo foi demonstrado, que o trauma causado pela eletroejaculação afetou a qualidade dos espermátóforos regenerados, estando a maioria em diferentes estágios de necrose ao final do experimento. Este efeito negativo obviamente afetou os índices de produtividade das desovas. Resultado semelhante foi encontrado por Pascual et al. (1998), que observaram alta variabilidade na qualidade reprodutiva dos machos de *P. setiferus*, que poderia ser uma evidência dos efeitos produzidos pela eletroejaculação realizada neste experimento. Segundo estes autores, a eletroestimulação poderia estar influenciando negativamente as funções testiculares, possivelmente por afetar a síntese do espermátóforo na ampôla terminal, ou o processo de maturação da espermátide. Já Goldberg e Oshiro (2000) obtiveram sucesso na técnica de eletroejaculação para a espécie *Macrobrachium rosenbergii*, assim como Jerry (2001), que testou a eficiência da eletroejaculação na lagosta de água doce *Cherax destructor* e observou que a técnica permitiu a expulsão completa ou parcial dos espermátóforos em 75% dos animais.

Utilizando a técnica de compressão abdominal, pressionando gentilmente a base do poro genital até a completa extração dos espermátóforos (ARCE et al., 1999; NIMRAT et al., 2006), Nakayama et al. (2008) obtiveram sucesso na regeneração dos espermátóforos e sobrevivência dos machos. Estes autores avaliaram os efeitos dos métodos de extrusão manual e elétrica sobre regeneração dos espermátóforos em reprodutores selvagens do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* e observaram que ambos os métodos foram eficientes para coleta inicial dos espermátóforos. Porém, concluíram que para a reutilização

dos machos, o método manual é mais indicado por apresentar espermátóforos de melhor qualidade após a regeneração.

A utilização de crioprotetores adequados e eficientes permite a manutenção da estrutura original da célula espermática, garantindo maiores taxas de viabilidade do sêmen. Para tanto, é necessário investigar o poder de proteção do agente crioprotetor, bem como sua possível toxicidade ao espermatozóide. Durante a congelação e a descongelação, os danos causados à célula são devido à ação destrutiva da concentrada solução de sais a qual as células são expostas quando a água é removida em forma de gelo (JEYALACTUMIE e SUBRAMONIAM, 1989). Diversos crioprotetores são capazes de prevenir tais danos à parede da célula durante a criopreservação, como o Glicerol, no qual a concentração eletrolítica a temperaturas abaixo do ponto de congelação é suficientemente reduzida segundo Lovelock e Polge (1954). Além do Glicerol, vários outros produtos foram estudados para exercer tal função, como o dimetil sulfóxido (DMSO), Etileno glicol, metanol e trealose, dentre outros também utilizados na criopreservação de sêmen e larvas de diversas espécies.

Akarasanon et al. (2004), com o objetivo de identificar um método ideal para a preservação a longo prazo de espermátóforos do camarão de água doce, *M. rosenbergii*, utilizaram Glicerol e Etileno glicol como agentes crioprotetores, nas diluições de 10 e 20% cada. Os autores observaram que para o teste de toxicidade nenhum crioprotetor, em suas diferentes diluições, apresentou diferença significativa quando comparado ao controle (espermátóforos frescos). Vuthiphandchai et al. (2005) testaram os crioprotetores metanol, etanol, Etileno glicol, propilenoglicol, DMSO, acetamida, formamida, Glicerol e sacarose em embriões de *Penaeus monodon*. Barth et al. (2006) utilizaram DMSO, metanol e Etileno glicol em diferentes concentrações para criopreservação de espermátóforo desta mesma espécie.

Para a congelação de sêmen de peneídeos, aqueles que vêm apresentando bons resultados foram o Glicerol e o DMSO, tendo este último apresentado, por exemplo, uma taxa de viabilidade espermática pós-descongelo de aproximadamente 90% em estudo de criopreservação de espermátóforos a longo prazo (VUTHIPHANDCHAI et al., 2007).

Salazar et al. (2008) testaram um protocolo para criopreservação de sêmen de *L. vannamei*, utilizando como crioprotetores o dimetilsulfóxido (DMSO), o Glicerol, o metanol e o Etileno glicol a 10%, e observaram baixa toxicidade destes agentes para os espermatozóides.

A velocidade de congelação, descongelação, bem como os métodos de criopreservação da massa espermática ou dos espermátóforos tem grande influência sobre a

viabilidade espermática. Diversos protocolos foram testados para espécies de crustáceos, moluscos e peixes e os resultados foram bastante variados. Chow et al. (1985) testaram três tempos de exposição (0, 5 e 10 minutos) ao vapor de nitrogênio líquido dos tubos com os espermatóforos de *M. rosenbergii* para uma pré-congelação, antes de serem submersos no nitrogênio líquido. Os autores observaram que os espermatóforos que sofreram o pré-congelamento obtiveram sucesso na fertilização, enquanto que aqueles imersos diretamente no nitrogênio líquido não apresentaram fertilização, concluindo então que a rápida congelação danifica a célula espermática. Resultado similar foi encontrado por Jeyalactumie e Subramoniam (1989), que compararam três métodos de criopreservação, em que inicialmente todas as massas espermáticas foram mantidas para tempo de equilíbrio a 4°C por 16 h, e depois divididas em três grupos. No primeiro, as palhetas antes de congelar foram expostas ao vapor do nitrogênio líquido por uma hora, para então serem completamente imersas em nitrogênio líquido, a -196°C. No segundo grupo as palhetas foram expostas a CO₂ gasoso por uma hora e então acondicionadas a -79°C diretamente em gelo seco. Já no terceiro grupo, as palhetas foram mantidas em um freezer a -4°C. Ao final de 30 dias observaram como melhores resultados para viabilidade espermática, o primeiro e o segundo grupo, que foram resfriados lentamente e criopreservados em nitrogênio líquido a -196°C e gelo seco a -79°C, respectivamente. Já os autores Bray e Lawrence (1998), com o objetivo de determinar a viabilidade espermática em espermatóforos de *L. vannamei* criopreservados em curto prazo (36 h) e resfriados a 15°C, concluíram que temperaturas entre 5 e 12 °C poderiam apresentar melhores resultados do que os de 15 °C, utilizados neste trabalho para retardar com maior eficiência a degradação dos tecidos. Akarasanon et al. (2004), também obtiveram melhor resultado para a viabilidade espermática, a criopreservação lenta com resfriamento até -70°C numa velocidade de 1,5-2,5°C.min⁻¹, sendo posteriormente exposto ao vapor de nitrogênio líquido por 2 min e então armazenamento em botijão criogênico com nitrogênio líquido, alcançando a temperatura final de -196°C.

Salazar et al. (2008) utilizaram um equipamento programável para congelação de sêmen e embriões, na criopreservação da massa espermática do camarão *L. vannamei*, numa velocidade de resfriamento de -0,5°C.min⁻¹ até a temperatura de -32°C, e depois as massas espermáticas foram transferidas para o nitrogênio líquido, alcançando a temperatura final de -196°C.

No entanto, observa-se que não existem trabalhos ou protocolos determinados para a criopreservação da massa espermática de *L. schmitti*, indicando a necessidade de se investigar métodos para a realização da técnica de estocagem de sêmen desta espécie a longo

prazo. Portanto, neste estudo será avaliado o efeito de toxicidade dos agentes crioprotetores sobre a viabilidade espermática, em diferentes concentrações, além da avaliação da influência do tempo de estocagem em nitrogênio líquido sobre a sobrevivência das células espermáticas do *L. schmitti*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado em duas fases experimentais, na primeira avaliou-se o efeito do tempo de equilíbrio e da concentração de diferentes crioprotetores sobre a viabilidade espermática. Na segunda fase foi avaliada a influência do tempo de manutenção em nitrogênio líquido e da concentração do crioprotetor sobre a viabilidade espermática do camarão branco *Litopenaeus schmitti*, utilizando os resultados da primeira fase experimental.

3.1 Localização e Grupos Experimentais

Os experimentos foram conduzidos na Estação de Biologia Marinha da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em Itacuruçá, município de Mangaratiba-RJ e no laboratório de sêmen e de embriões no Departamento de Reprodução e Avaliação Animal no campus da UFRRJ em Seropédica (RJ) (LRA) no período de setembro a dezembro de 2009.

Para as duas fases experimentais os camarões selvagens machos, sexualmente maduros de *Litopenaeus schmitti* (Figura 1) foram capturados por pescadores na Baía de Sepetiba (Figura 2) e distribuídos aleatoriamente em cinco caixas de polietileno com capacidade para 500L, numa densidade de 8 indivíduos/caixa e aclimatados por uma semana. Foi mantido um fotoperíodo artificial de 14 horas de luz e 10 horas de escuro ao longo de todo o período experimental.

Todas as caixas foram dotadas de comedouro (Figura 3A) e pedaços de canos de PVC, que funcionavam como abrigo para os animais, além de aeração constante e fluxo contínuo de água do mar filtrado pelo filtro biológico e UV. O volume de água das caixas foi substituído em torno de 60% ao dia e a limpeza destas caixas realizada em dias alternados. Para manter a temperatura da água em torno de 26°C foram utilizados dois aquecedores elétricos com termostato (ATNA Eletronic Heater, 200W) em cada caixa (Figura 3A).

Os parâmetros temperatura, pH, salinidade e oxigênio dissolvido foram mensurados diariamente, enquanto os níveis de amônia e nitrito foram obtidos semanalmente.

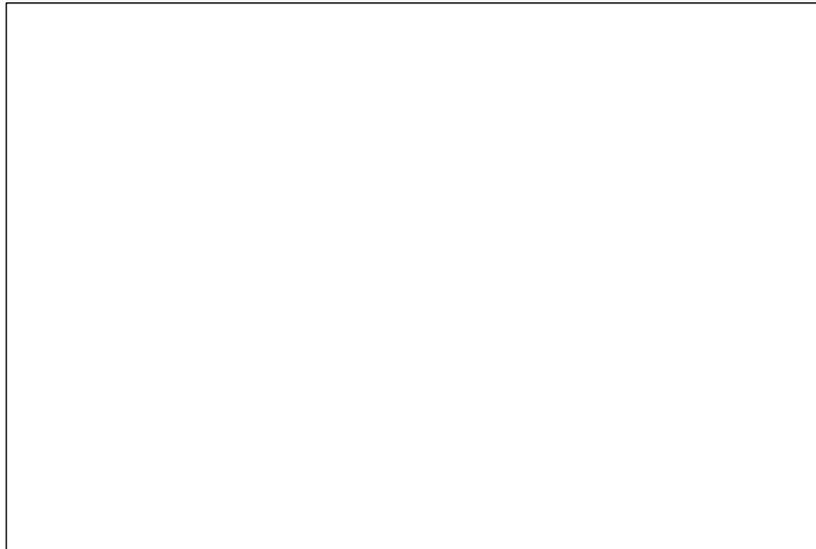


Figura 1. Indivíduo macho maduro do camarão branco *Litopenaeus schmitti*, em detalhe espermatóforo maduro apresentando boas características externas.

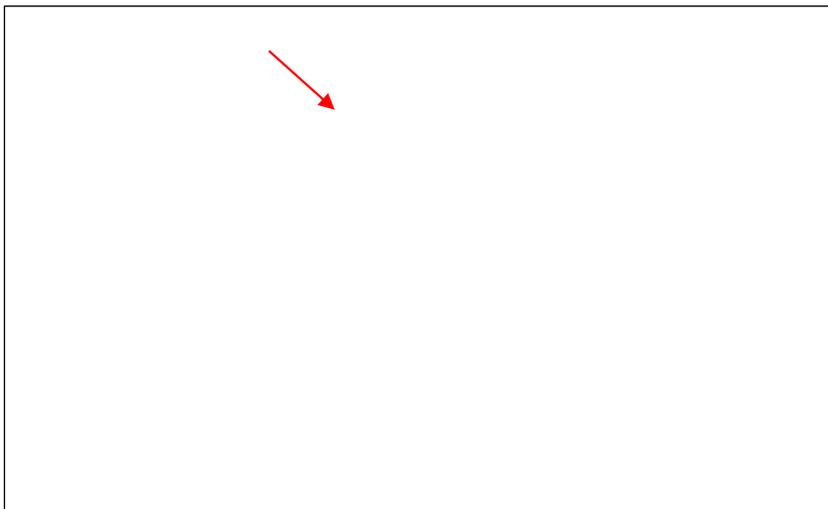


Figura 2. Mapa da baía de Sepetiba, local da captura dos camarões próximo da pedreira de Muriquí (indicado com a seta vermelha).

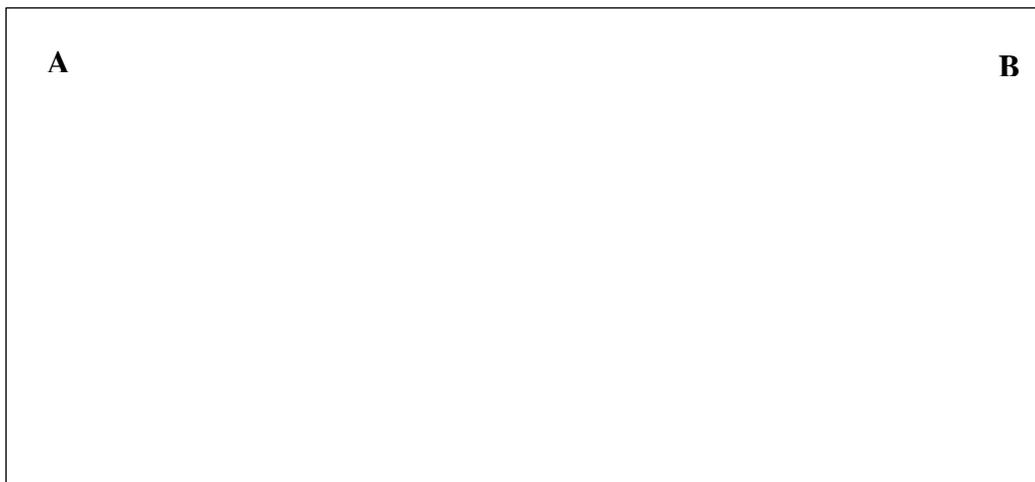


Figura 3. (A) Caixa de polietileno onde foram acondicionados os camarões, contendo comedouro e aquecedor. (B) Instalações da Estação de Biologia Marinha.

3.2 Primeira fase experimental

Na primeira fase foram utilizados 32 espermatóforos de 40 machos com peso e comprimento médios de $17,89 \pm 4,11$ g e $11,57 \pm 1,00$ cm respectivamente. Os espermatóforos completamente maduros foram removidos pela técnica de compressão abdominal (ARCE et al., 1999 e NIMRAT et al., 2006) (Figura 4). Somente foram selecionados os espermatóforos que apresentavam coloração branca, de tamanho grande e túrgidos segundo o padrão de qualidade sugerido por Jar (2005).

Os espermatóforos foram medidos e pesados ($6,84 \pm 1,64$ mm e $0,114 \pm 0,06$ g) em balança analítica (precisão 0,001 g), e em seguida foram retiradas as massas espermáticas dos mesmos, que foram imersas em Glicerol e DMSO nas concentrações de 5% e 10%, diluídos em solução salina livre de cálcio (VUTHIPHANDCHAI et al., 2007) (Tabela 1) e colocados em microtubos. Estes foram colocados, à temperatura ambiente (25°C) na qual foram testados 2 tempos de equilíbrio, 10 e 30 minutos, perfazendo um total de 8 tratamentos (concentração do crioprotetor x tempo de equilíbrio) e 4 repetições.



Figura 4. Extração do espermatóforo do camarão branco *Litopenaeus schmitti* através da técnica de compressão abdominal.

Tabela 1 Composição da solução salina

Reagentes	Quantidade
NaCl	2,163 g
KCl	0,112 g
H3BO3	0,053 g
NaOH	0,019 g
MgSO47H2O	0,493 g
H2O destilada	100 mL q.s.p.

A viabilidade espermática foi avaliada através do esfregaço de sêmen corado com eosina-nigrosina segundo Jeyalectumie e Subramoniam (1989), com pequena alteração, onde foram adicionados 25 μ L de eosina a 0,5% e 25 μ L de nigrosina a 10%, em 50 μ L de solução espermática. E após homogeneização de 100 μ L resultantes de solução corada, realizou-se o esfregaço em lâmina de microscopia, que foi seca ao ar antes da observação em microscópio óptico. A porcentagem média para a viabilidade 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), já as células vivas não apresentavam coloração, mostrando-se translúcidas em contraste com o fundo arroxado da nigrosina (Figura 5).

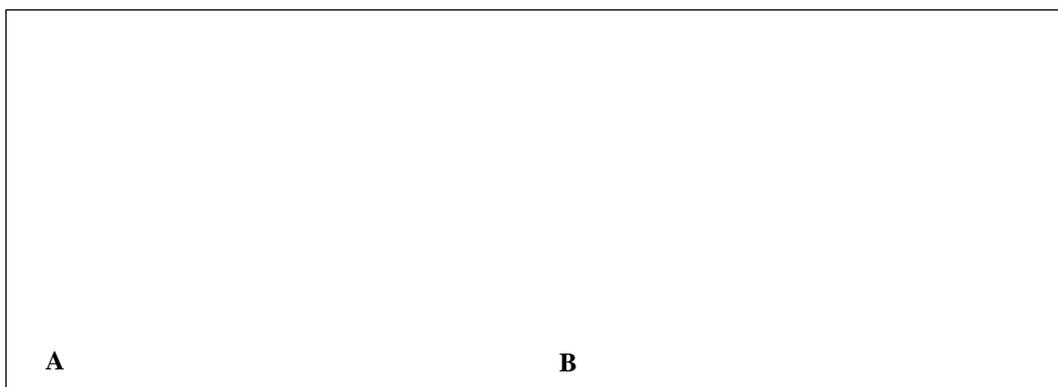


Figura 5. Esfregação em lâmina da massa espermática do camarão *Litopenaeus schmitti*, observado em microscópio óptico. A) células mortas; B) células vivas.

3.3 Segunda fase experimental

Para a segunda fase experimental foram utilizados 36 espermatóforos de 40 machos com peso e comprimento médios de $19,27 \pm 2,19$ g e $12,14 \pm 0,63$ cm, respectivamente. Os espermatóforos foram removidos como no primeiro experimento, obtendo médias de $7,98 \pm 0,61$ mm de comprimento e $0,134 \pm 0,121$ g de peso.

Para a criopreservação, a massa espermática dos espermatóforos foi transferida para o Glicerol a 5% e 10%, à temperatura ambiente (25°C), na qual permaneceram em equilíbrio por 10 minutos. Posteriormente, os espermatozóides foram resfriados segundo o protocolo do equipamento Cryogen da Neovet (Figura 6). O protocolo realiza a criopreservação em duas etapas, onde inicialmente ocorre a estabilização da máquina a -6°C e posterior inserção das palhetas contendo a solução de massa espermática e crioprotetor. Após 2 minutos realiza-se o procedimento de seeding e a máquina é novamente estabilizada por 10 minutos. Posteriormente inicia-se a redução da temperatura de -6°C a -32°C , a uma velocidade de resfriamento de $-0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Ao alcançar a temperatura final de -32°C aguarda-se a estabilização do equipamento por 5 minutos, neste ponto as palhetas são removidas e imediatamente imersas em nitrogênio líquido alcançando a temperatura de -196°C .

Este protocolo de resfriamento foi selecionado por se aproximar daquele utilizado por Salazar et al. (2008), na realização do protocolo para criopreservação do sêmen de *L.vannamei*, visto que esta espécie pertence à mesma família do *L.schmitti*, objeto de estudo nesta pesquisa.

Os 6 tratamentos consistiram do tempo de manutenção da massa espermática em nitrogênio líquido (24 horas, 15 e 30 dias) e 2 concentrações do Glicerol (5 e 10%), cada tratamento com 6 repetições.

Concluídos os tempos de manutenção no estado congelado, a massa espermática foi retirada do nitrogênio líquido, e imediatamente imersa em água à 20°C por 10 segundos para a descongelação segundo o protocolo utilizado por Salazar et al. (2008). A análise de viabilidade espermática foi realizada através do esfregão de sêmen corado com eosina-nigrosina como descrito na primeira fase experimental.

Figura 6. Tanque de armazenamento de sêmen em nitrogênio líquido (a esquerda) e equipamento de criopreservação de sêmen e embriões Cryogen da Neovet (a direita).

Para ambos os experimentos, os animais foram alimentados 2 vezes/dia com 50% da ração industrializada INVE (45% PB) (Tabela 2) e 50% da massa de alimento fresco contendo músculo de peixe, lula, mexilhão, artêmia e camarão (Tabela 3) na proporção de 3,5% da biomassa.

Tabela 2. Composição bromatológica da ração INVE utilizada na alimentação dos machos reprodutores *L. schmitti* durante os experimentos.

Nutriente	Composição (%)
Proteína Bruta	52,29
Matéria Seca	87,94
Extrato Etéreo	10,83
Matéria Mineral	9,18
Fibra bruta	0,85

Tabela 3. Proporção dos alimentos frescos utilizados na alimentação dos machos reprodutores *L. schmitti* durante os experimentos.

Alimento fresco	Proporção (%)
Músculo de peixe	45

Lula	15
Mexilhão	15
Artêmia	15
Camarão	10

3.4 Análise estatística

O primeiro experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com quatro concentrações de crioprotetores por dois tempos de equilíbrio e 4 repetições. Os dados de mortalidade não apresentaram distribuição normal, portanto foi realizada análise de variância não paramétrica, em seguida o Teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de significância. Os dados foram transformados para arcoseno da raiz de x .

Para o segundo experimento foram avaliadas duas diluições do Glicerol em três tempos de criopreservação, com 6 repetições. Este foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com esquema de parcela subdividida, onde as diluições do crioprotetor foram alocadas na parcela inteira e os tempos de "congelamento" na parcela dividida. Realizou-se ANOVA e o Teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Os dados foram transformados para arcoseno da raiz de x .

As duas análises foram realizadas através do programa SAEG 9.1 (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas) (2007).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito da concentração dos crioprotetores DMSO e Glicerol e do tempo de equilíbrio sobre a viabilidade espermática.

Na primeira fase experimental os valores médios da temperatura da água foram $26,58 \pm 0,33^{\circ}\text{C}$, salinidade $33,00 \pm 0,50$, pH $7,2 \pm 0,01$, oxigênio dissolvido $6,92 \pm 0,55$, amônia $0,008 \pm 0,001$ e nitrito $0,25 \pm 0,20$. Estas variáveis provavelmente não influenciaram na qualidade espermática dos machos por estarem dentro dos padrões considerados ótimos para a manutenção de reprodutores de *L. vannamei*, segundo Barbieri Junior e Ostrensky Neto, (2002).

De acordo com a análise dos dados, não houve diferença significativa entre os tratamentos, Glicerol e DMSO nas concentrações de 5% e 10 %, nem entre os dois tempos de equilíbrio testados, 10 e 30 minutos (Figura 7).

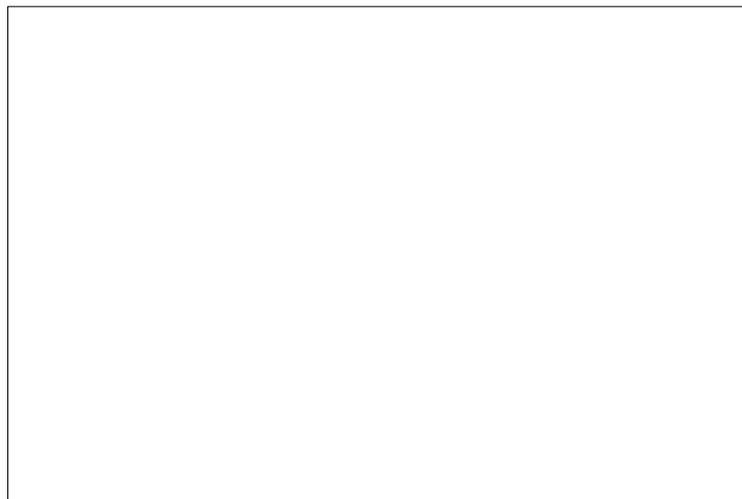


Figura 7. Viabilidade espermática do *Litopenaeus schmitti* após exposição em Glicerol e DMSO em duas concentrações, 5% e 10 %, e submetidos a dois tempos de equilíbrio, 10 e 30 minutos.

Chow et al. (1985) utilizaram 7 diferentes tempos de estabilização de 0, 10, 15, 30, 60, 120 e 180 min em dois meios base de equilíbrio dos espermátóforos de *M. rosenbergii*, contendo água filtrada em carbono ativado ou solução salina fisiológica cada uma contendo Glicerol 10% (V/V) como crioprotetor e observaram que quanto maior o tempo de estabilização maior o volume e peso do espermátóforo, indicando maior penetrância do crioprotetor ao longo do tempo. Estes autores não observaram efeitos tóxicos do Glicerol, mas uma eficiente atividade protetiva às células espermáticas contra os efeitos da

criopreservação. No entanto, um contato mais prolongado do espermatozóide com o agente crioprotetor pode ter efeitos negativos, potencializando a toxicidade deste agente e reduzindo a viabilidade espermática.

Huang et al. (2004) avaliaram cinco tempos de estabilização de 10, 20, 30, 60 e 120 minutos, do espermatozóide de *Xiphophorus helleri* em Glicerol 14% e encontraram a menor viabilidade aos 120 minutos e a maior aos 20 minutos, não havendo diferença significativa entre os tempos de 10, 20 e 30 minutos. Este resultado concorda com o presente estudo, não sendo observada diferença significativa entre os tempos de equilíbrio de 10 e 30 minutos, utilizando o Glicerol como agente crioprotetor.

Vuthiphandchai et al. (2007) testaram a toxicidade de 5 agentes crioprotetores, DMSO, Etileno glicol, propileno glicol, formamida e metanol, em 4 tempos de estabilização de 10, 20, 30 ou 60 minutos. Os autores observaram redução significativa na viabilidade espermática quando o espermátóforo foi exposto ao DMSO 5% por 60 minutos, e quando testado com DMSO 10% a viabilidade declinou gradativamente ao longo do tempo de exposição ao crioprotetor. A viabilidade encontrada nos outros crioprotetores foi significativamente baixa e reduziu ainda mais conforme o aumento do tempo de exposição a estes agentes.

No presente estudo, o reduzido tempo de estabilização (10 e 30 minutos) a que as massas espermáticas foram expostas aos crioprotetores DMSO e Glicerol, pode ter contribuído para a baixa toxicidade destes.

Anchordoguy et al. (1988) investigando a criopreservação de células espermáticas de *Sicyonia ingentis*, testaram Glicerol, DMSO, trealose, sacarose e prolina como agentes crioprotetores. Esses autores observaram que o DMSO sozinho ou em combinação com outro crioprotetor conferiu melhor viabilidade espermática, contrastando com os resultados do presente trabalho em que o DMSO não apresentou diferença significativa sobre o Glicerol.

Jeyalectumie e Subramoniam (1989) trabalhando com criopreservação de espermátóforo e plasma seminal de *Scylla serrata*, observaram maior eficiência dos crioprotetores Glicerol e DMSO+trealose na viabilidade espermática, concordando com o atual estudo que não apresentou diferença entre estes agentes. Da mesma forma, Huang et al. (2004) avaliaram o efeito dos crioprotetores DMSO, Glicerol, *N*-dimetil formamida (DMF), *N*-dimetil acetamida (DMA), Propileno glicol (P-Glicol), Metanol e Sacarose, sobre a motilidade espermática do peixe ornamental *X. helleri* e encontraram melhores resultados com Glicerol e DMSO, não havendo diferença significativa entre estes crioprotetores. Portanto, concordando com o resultado do presente estudo.

No entanto, Kawamoto et al. (2007), apesar de não encontrar diferença significativa entre DMSO e Glicerol a 10%, concordando com o presente estudo, observaram nestes crioprotetores as menores taxas de viabilidade espermática para o espermatozóide da ostra perolífera, *Pinctada fucata martensii*.

Lanes (2008), que avaliou a viabilidade espermática do linguado, *Paralichthys orbignyanus*, após criopreservação em DMSO 10% e Glicerol 12%, também não observou diferença significativa entre os crioprotetores, corroborando com o presente estudo, mas obteve baixa taxa de viabilidade espermática para os dois agentes crioprotetores.

Esta baixa viabilidade conferida pelo DMSO e Glicerol de 25,5% e 21,3%, respectivamente, encontrada por Kawamoto et al. (2007), e para DMSO e Glicerol, 43% e 20% respectivamente, observada por Lanes (2008), não corresponde aos valores encontrados no presente estudo para a massa espermática do *L. schmitti*, como demonstrado na Figura 7.

Salazar et al. (2008), trabalhando com massa espermática de *L. vannamei*, não encontraram diferenças significativas entre os agentes crioprotetores (DMSO, Glicerol, metanol e Etileno glicol a 10%), também concordando com o resultado do presente estudo.

Huang et al. (2004) testaram a influência das concentrações de 5, 8, 10, 12, 14, 17 e 20% dos crioprotetores DMSO e Glicerol sobre a motilidade espermática do *X. helleri*. Para o teste com o DMSO, esses autores obtiveram como melhores resultados as concentrações de 10 e 12%, observando que o aumento da concentração do crioprotetor provocou um rápido declínio na viabilidade dos espermatozóides. No teste com o Glicerol, esses autores encontraram a maior taxa de motilidade espermática com a concentração de 14% e a menor taxa com 5%.

Já no presente estudo não foi observada diferença significativa entre as concentrações testadas de 5 e 10% para o DMSO e o Glicerol (Figura 7), onde as taxas de viabilidade espermática variaram de 78,37% a 97,42%, demonstrando uma baixa toxicidade destes crioprotetores, quando utilizados nestas concentrações para os espermatozóides de *L. schmitti*.

Akarasanon et al. (2004) testaram a toxicidade dos agentes crioprotetores Glicerol e Etileno glicol ao espermatozóide de *M. rosenbergii*, nas concentrações de 10 e 20%, mas não encontraram diferença significativa na viabilidade espermática entre os tratamentos. No presente estudo, o Glicerol nas concentrações de 5 e 10%, também não apresentaram diferença estatística no teste de toxicidade aos espermatozóide de *L. schmitti*.

Bart et al. (2006), trabalhando com camarão tigre, *Penaeus monodon*, realizaram a criopreservação de espermatóforos por 48 horas em DMSO nas concentrações de 5 e 10%,

como agente crioprotetor. Os autores encontraram o DMSO 5% como melhor resultado ao obter viabilidade espermática de 79,7%, e observaram que o aumento na concentração do DMSO para 10% provocou a redução na sobrevivência dos espermatozoides.

Vuthiphandchai et al. (2007), utilizando espermatóforos de *Penaeus monodon*, testaram a toxicidade dos agentes crioprotetores DMSO, Etileno glicol, Propileno glicol, Formamida e Metanol nas seguintes concentrações: 5, 10, 15 e 20%; e obtiveram maiores taxas de viabilidade espermática nas concentrações de 5 e 10 % do DMSO, corroborando com o presente estudo. Esses mesmos autores observaram também, comportamento inversamente proporcional entre a viabilidade espermática e a concentração do DMSO, demonstrando que os crioprotetores tornam-se mais tóxicos às células espermáticas à medida em que se aumenta a concentração destes. Este comportamento não pode ser observado no atual estudo, provavelmente, por não ter sido testada uma maior amplitude de concentrações dos crioprotetores.

4.2 Influência da concentração do Glicerol e do tempo de manutenção em nitrogênio líquido sobre a viabilidade espermática

Para a segunda fase experimental os valores médios da temperatura da água foram $27,14^{\circ}\text{C} \pm 0,50$, salinidade $33,53 \pm 0,69$, amônia $0,010 \pm 0,007$, nitrito $0,30 \pm 0,24$, oxigênio dissolvido $6,78 \pm 0,25$ e pH $7,8 \pm 0,01$. Estas variáveis provavelmente não influenciaram na qualidade espermática dos machos por estarem dentro dos padrões considerados ótimos para a manutenção de reprodutores de *L. vannamei*, segundo Barbieri Junior e Ostrensky Neto (2002).

Na execução desta segunda fase o agente crioprotetor Glicerol foi selecionado, uma vez que não houve diferença significativa entre a utilização do Glicerol e do DMSO na primeira fase experimental. Além disso o Glicerol pode ser um produto encontrado com maior facilidade no mercado e apresentar menor valor comercial em relação a outros agentes crioprotetores, que apresentaram resultados satisfatórios em estudos de criopreservação de sêmen e embriões de camarões peneídeos (ANCHORDOGUY et al., 1988; JEYALECTUMIE e SUBRAMONIAM, 1989; SALAZAR et al., 2008).

Após a análise dos dados não foi constatada diferença significativa entre as concentrações do Glicerol a 5 e 10%, entretanto observou-se diferença significativa para a sobrevivência ao longo do tempo de manutenção em nitrogênio (Tabela 5) (Figura 9).

Tabela 4. Médias da viabilidade espermática do camarão *L. schmitti* estocados em Glicerol 5% e 10% por 24 horas, 15 e 30 dias.

TEMPO	Médias	Comparações 5%
24 horas	0.7869	A
15 dias	0.6941	A B
30 dias	0.3479	B

Valores com letras diferentes na coluna são significativamente diferentes entre os tratamentos ($P < 0,05$).

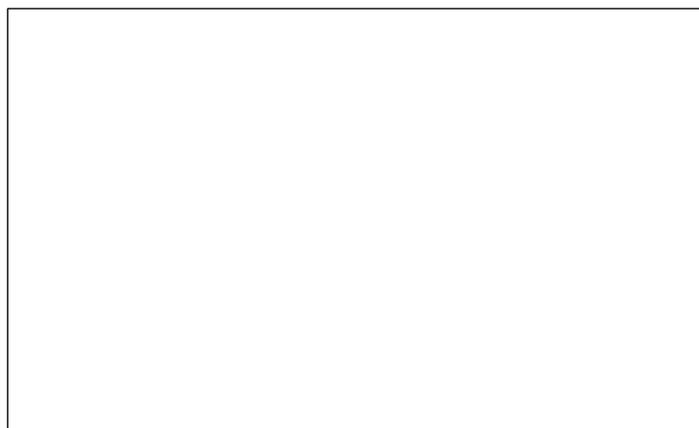


Figura 8. Percentual de sobrevivência espermática após criopreservação em Glicerol a 5% e 10% , e média dos tratamentos por 1, 15 e 30 dias.

Chow et al. (1985) observaram alta mortalidade de espermatozóides de *M. rosenbergii* quando não foi realizada uma pré-congelação, antes da total imersão do sêmen no nitrogênio líquido, concluindo que a rápida congelação danifica a célula espermática. Estudando a congelação de espermatozóides do camarão marinho *S. ingentis* Anchordoguy et al. (1988) também obtiveram melhores resultados utilizando a congelação gradual, com uma velocidade de $1,0^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$.

Jeyalactumie e Subramoniam (1989), criopreservaram espermatóforos de *Scylla serrata* em três temperatura finais, sendo que antes da congelação a -196°C , as amostras foram expostas ao vapor de nitrogênio por uma hora e então imersas em nitrogênio líquido. Antes da congelação a -79°C as amostras foram expostas ao vapor de CO_2 por uma hora e então acondicionadas diretamente em gelo seco, e as amostras a -4°C foram mantidas em freezer. Após 30 dias de criopreservação todos os métodos de resfriamento apresentaram alta viabilidade espermática variando de 95% (-196°C) a 80% (-4°C).

Dumont et al. (1992) criopreservaram espermatóforos de *L. vannamei* em Glicerol 15% numa velocidade de resfriamento de $4,5^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, da temperatura ambiente até -30°C , antes de armazenar em nitrogênio líquido e obteve taxas de fertilidade de 41%.

Akarasanon et al. (2004) realizaram a criopreservação de espermátóforos de *M. rosenbergii* em duas temperaturas finais, sendo que para criopreservar a -20°C as amostras foram imediatamente acondicionadas a -20°C ; e para a criopreservação a -196°C utilizaram uma velocidade de resfriamento de $1,5$ a $2,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até -70°C , depois as amostras foram expostas ao vapor de nitrogênio de 1 a 2 minutos, e então imersas em nitrogênio líquido. Ao final de 350 dias, os autores encontraram maior viabilidade espermática ($>70\%$), nas amostras resfriadas gradualmente e criopreservadas a -196°C , em detrimento àquelas acondicionadas imediatamente a -20°C , que obtiveram taxas de sobrevivência próximas de zero.

Vuthiphandchai et al. (2007) testaram as velocidades de congelação -2 , -4 , -6 , -8 , -10 , -12 , -14 e $-16^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ para criopreservação dos espermátóforos de *P. monodon*, em três diferentes temperaturas finais de congelação, sendo -30°C e -80°C , mantidos a estas temperaturas por 2 min e descongelados; e a -80°C depois imerso em nitrogênio líquido (-196°C) por 24 horas. Para a temperatura final de -30°C a viabilidade foi alta ($98,8$ a $96,3\%$) independente das taxas de congelação, mas na temperatura final de -80°C somente foram observados espermatozoides viáveis nas velocidades $-2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ($83,3\%$), ocorrendo o mesmo, quando os espermátóforos foram criopreservados a -196°C por 24 horas, obtendo taxa de viabilidade de $93,3\%$.

Nimrat et al. (2008), seguindo o protocolo $-2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até -80°C depois imersão em nitrogênio líquido e temperatura final de -196°C (VUTHIPHANDCHAI et al., 2007), encontraram taxas de $86,7\%$ de viabilidade espermática após 60 dias de criopreservação do espermátóforo de *P. monodon*. Enquanto Salazar et al. (2008), utilizaram no protocolo de criopreservação do sêmen de *L. vannamei*, a velocidade de resfriamento de $0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ da temperatura ambiente até -32°C e posterior imersão em nitrogênio líquido (-196°C), por um período de 72 horas. As autoras obtiveram taxa de até 60% de sobrevivência, utilizando Metanol 10% como agente crioprotetor e utilizando a massa espermática como material biológico.

Jeyalactumie e Subramoniam (1989) realizaram criopreservação de espermátóforos de *S. serrata* a -196°C , -79°C e a -4°C , por até 30 dias e não observaram mudanças marcantes na viabilidade espermática ao longo do tempo, apresentado uma taxa de sobrevivência de até 95% quando utilizado o Glicerol como agente crioprotetor, e de 89% para o DMSO, no 30º dia de estocagem em nitrogênio líquido. Este resultado não concorda com o encontrado no atual estudo onde se observou uma queda significativa da viabilidade espermática ao longo

dos 30 dias de criopreservação em nitrogênio líquido, utilizando o glicerol como agente crioprotetor.

No presente trabalho observou-se uma média de sobrevivência de 50,7% com 24 horas de congelação. Tomando-se por base os valores da sobrevivência das primeiras 24 horas de congelação, verificou-se uma queda na sobrevivência espermática de 15,2% aos 15 dias e de 68% no 30º dia de criopreservação. Não houve diferença significativa para as médias de sobrevivência após 24 horas e o 15º dia de criopresevação. No entanto, foi observada diferença significativa entre o 15º e 30º dia, onde foram observadas taxas de viabilidade espermática muito reduzida, chegando a uma média de 16,26% de sobrevivência no final do experimento.

Resultado semelhante foi obtido por Akarasanon *et al.* (2004a), com sêmen de *M. rosenbergii* criopreservado a -20°C por até 20 dias, utilizando Glicerol 10 ou 20%, e Etileno glicol a 10 ou 20% como agentes crioprotetores. Os autores concluíram que quanto maior o tempo de criopreservação, menor a viabilidade espermática, tendo observado que esta redução foi ntensificada após o 10º dia de estocagem. Quando o espermatóforo foi criopreservado a -196°C em Etileno glicol 20%, os autores também observaram uma redução da viabilidade espermática de acordo com o tempo de estocagem em nitrogênio líquido, entretanto foi uma redução mais atenuada onde foram observadas altas taxas de sobrevivência (>75%) dos espermatozóides até o 200º dia.

Nimrat *et al.* (2006) realizaram criopreservação de espermatóforos de *L. vannamei* por até 35 dias utilizando Óleo mineral, Solução de Ringer, Tampão fosfato e NaCl 0,85%. O Óleo mineral obteve melhores resultados variando de 90% no início do experimento a 55% após o 35º dia de criopreservação. Portanto os autores observaram queda significativa na viabilidade espermática ao longo do tempo, sendo esta redução mais proeminente a partir do 14º dia do experimento, assim como foi observado no presente estudo com massa espermática de *L. schmitti*.

No presente estudo a congelação foi feita através da redução gradual (0,5°C.min⁻¹), segundo protocolo do equipamento Cryogen da Neovet para criopreservação de embriões de bovinos, utilizando a massa espermática como material biológico para criopreservação. No entanto durante o processo de congelação o equipameto apresentou oscilações na velocidade de resfriamento do sêmen, possivelmente não respeitando o protocolo determinado pelo fabricante. Portanto, a baixa sobrevivência encontrada nos tratamentos e o resultado diferente do esperado, pode ter sido influenciado negativamente por esta oscilação sugerindo, a

necessidade de repetir a segunda fase experimental, bem como a utilização de um outro equipamento de congelação gradual para comparação.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo em relação à avaliação de técnicas para a criopreservação do sêmen de *Litopenaeus schmitti*, nas condições em que este trabalho foi executado, pode-se concluir:

O Glicerol e o DMSO podem ser utilizados como agentes crioprotetores para congelação de espermatozóides de *Litopenaeus schmitti*.

O agente crioprotetor Glicerol pode ser utilizado para a criopreservação de espermatozóides de *Litopenaeus schmitti* em nitrogênio líquido por até 30 dias.

A baixa viabilidade espermática após 15 dias, sugere a necessidade de repetir a segunda fase experimental, bem como a utilização de um outro equipamento de congelação gradual, que possibilite uma comparação.

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**, n.35, p.1415-1420, 2004.

ALFARO-MONTOYA, J. Reproductive quality evaluation of male *Penaeus stylirostris* from a grow-out pond. **Journal of the World Aquaculture Society**. n.24, p.6–11, 1993.

ALFARO-MONTOYA, J. The reproductive conditions of male shrimps, genus *Penaeus*, sub-genus *Litopenaeus* (open thelyca penaeoid shrimps). A review. **Aquaculture**, n. 300, v. 1-4, p. 1-9, 2010.

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.

BARBIERI JÚNIOR, R. C.; OSTRENSKY NETO, A. **Camarões Marinhos – Reprodução, Maturação e Larvicultura**. Viçosa – MG: Aprenda Fácil Editora. v. 1, 255p. 2002.

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

BROWN, A. Jr.; TALBOT, P.; SUMMERS, R. G.; CLARK, W. H. Jr.; Comparative analysis of decapod sperm. **Journal of Cell Biology**. n.75, p.170 A.

BUENO, S. L. S., 1989. Técnicas, procedimentos e manejos para a produção de pós-larvas de camarões peneídeos: uma experiência vivida pela Maricultura da Bahia. **CIRM**, Brasília.107 p.

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

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

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

GILLET, R. Global study of shrimp fisheries. **FAO Fisheries Technical Paper**. n. 475, Roma, FAO, 331p, 2008.

GOLDBERG, R.S.; OSHIRO, L.M.Y. Eficiência da Eletroejaculação de Morfotipos Machos do Camarão-de-água-doce *Macrobrachium rosenbergii*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, n.29, v.1, p.1-5, 2000.

GUITART, B., GONZÁLEZ, E., REYES, R., FRAGA, I. Descripción del aparato reproductor masculino de *Penaeus notialis* y *Penaeus schmitti*. **Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras**. n.10, p. 41-58, 1985.

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

FAO, 2009. The state of world fisheries and aquaculture 2008. Fisheries and Aquaculture Department **FAO**, Rome. 218 pp.

HOLTHUIS, L. B. FAO species catalogue. Vol. 1 – Shrimps and prawns of the world. In annotated catalogue of species of interest to fisheries. **FAO Fisheries Synopsis**, n.125, v.1, 271 pp, 1980.

IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). DIFAP (Diretoria de Fauna e Recursos Pesqueiros). CGREP (Coordenação-Geral de Gestão de Recursos Pesqueiros). **Estatística da pesca 2007: Brasil – grandes regiões e unidades da federação**. 2007. Brasília, 151p. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/recursos-pesqueiros/documentos/estatistica-pesqueira/>. Acesso em: 02 mar. 2010.

Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer. IFREMER. **Production mondiale**. Última atualização em: 19.09.2008. Disponível em:

<http://wwz.ifremer.fr/aquaculture/statistiques_mondiales/les_crustaces/production_mondial>

Acesso em: 14 jan. 2010.

JAR, L.P. **Fisiología y calidad reproductiva de machos de camarón blanco *Litopenaeus schmitti* en condiciones de cautiverio**. 2005. 150 p. Tese (Doutorado em Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales) – Centro de investigaciones biológicas del Noroeste, La Paz, 2005.

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

KAWAMOTO, T.; NARITA, T.; ISOWA, K.; AOKI, H.; HAYASHI, M.; KOMARU, A.; OHTA, H. Effects of cryopreservation methods on post-thaw motility of spermatozoa from the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. **Cryobiology**, n.54, p.19-26, 2007.

KURUVILLA, S.; FERREIRA, L.; SOOMAI, S.; JACQUE, A. 2000. **Economic performance and technological features of marine capture fisheries: the trawl fishery of Trinidad and Tobago**. Regional Workshop on the Effects of Globalization and Deregulation on Fisheries in the Caribbean. Castries, Saint Lucia, 4 December. 49 pp.

LANES, C.F.C. **Caracterização, criopreservação e manipulação genética do sêmen do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei:Paralichthyidae)**. 2008. 98 p. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Aqüicultura) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008.

LEUNG-TRUJILLO, J. R. and LAWRENCE, A. L. Observations on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions. **Aquaculture**, n.65, v.3-4, p.363-370, 1987.

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

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

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

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

OSHIRO, L. M. Y. et al. 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.

PASCUAL, C.; VALERA, E.; RE-REGIS, C.; GAXIOLA, G.; SANCHEZ, A.; RAMOS, L.; SOTO, L.A.; ROSAS, C. Effect of water temperature on reproductive tract condition of *Penaeus setiferus* adult males. **Journal of Aquaculture Society**, n.29, v.4, p. 477-484, 1998.

PEIXOTO, S.; CAVALLI, R.O.; WASIELESKY, W.; D'INCAO, F.; KRUMMENAUER, D.; MILACH, A.M. Effects of age and size on reproductive performance of captive *Farfantepenaeus paulensis* broodstock. **Aquaculture**, n.238, p.173–182, 2004.

PÉREZ-FARFANTE, I. Sinopsis de datos biológicos sobre el camarón blanco *Penaeus schmitti* Burkenroad, 1936. **FAO Fishing Reproduction**, n.57, v.4, p.1417-1433, 1970.

PÉREZ-FARFANTE, I. Spermatophores and thelyca of the American white shrimps, genus *Penaeus*, subgenus *Litopenaeus*. **Fishery Bulletin**, United States, n.73, p.463-486, 1975.

PÉREZ-FARFANTE, I., KENSLEY, B. Penaeoid and Sergestoid shrimps and prawns of the world, keys and diagnoses for the species and genera. Mémoires Muséum National d'Histoire Naturelle, **Zoologie**, n.175, 235 pp, 1997.

PEREZ-VELAZQUEZ, M.; BRAY, W.A.; LAWRENCE, A.L.; GATLIN III, D.M.; GONZALEZ-FELIX, M.L. Effect of temperature on sperm quality of captive *Litopenaeus vannamei* broodstock. **Aquaculture**, n.198, p.209–218, 2001.

RAMOS, L.; MOLINA, J.; SAMADA, S.; ESPEJO, M. Maturation and reproduction of pond-reared *Penaeus schmitti*. **Journal of the World Aquaculture Society**, n.26, p.183-187, 1995.

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

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. **Aspectos bioecológicos e pesqueiros de três espécies de camarões do gênero *Penaeus* nas costas do Estado do Rio de Janeiro e experimentos de cultivo**. 1977. 74p. Dissertação de Mestrado – UFRJ. Rio de Janeiro, 1977.

TALBOT, P.; SUMMERS, R. G. The structure of sperm from *Panulirus*, the spiny lobster, with special regard to the acrosome. **Journal Ultrastructure Research**, n.64, p.341-351.

TIZOL, R.; ZARAGOZA, I.; REGUEIRA, E.; ARTILES, M. Evaluation of different foods on reproduction of white shrimp *Penaeus schmitti*. **Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras**, n.20, v.2, p.31-34, 1996.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. SAEG – **Sistema de análises estatísticas e genéticas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007. Manual do usuário, 150p. (versão 9.1).

VUTHIPHANDCHAI, V.; BOONPRASERT, P.; NINRAT, S. 2005. Effects of cryoprotectant toxicity and temperature sensitivity on the embryos of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture**, v. 246, p. 275-284.

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**, n.68, p.1192-1199, 2007.

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