



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

FRANCISCO HIAGO GADELHA MOREIRA

**RESFRIAMENTO DE ESPERMATÓFOROS E INSEMINAÇÃO ASSISTIDA EM
CAMARÃO MARINHO *Penaeus vannamei* (Boone, 1931)**

FORTALEZA

2021

FRANCISCO HIAGO GADELHA MOREIRA

RESFRIAMENTO DE ESPERMATÓFOROS E INSEMINAÇÃO ASSISTIDA EM
CAMARÃO MARINHO *Penaeus vannamei* (Boone, 1931)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Aquicultura.

Orientadora: Profa. Dra. Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley.

Coorientadora: Dra. Larissa Teixeira Nunes

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M837r Moreira, Francisco Hiago Gadelha.
Resfriamento de espermatozóides e inseminação assistida em camarão marinho *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) / Francisco Hiago Gadelha Moreira. – 2021.
31 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2021.
Orientação: Profa. Dra. Carminda Sandra Brito Salmito Vanderley.
Coorientação: Profa. Dra. Larissa Teixeira Nunes.
1. Reprodução de camarões. 2. Água de coco em pó. 3. Óleo Mineral. 4. Criopreservação de espermatozóides de camarão. I. Título.

CDD 639.2

FRANCISCO HIAGO GADELHA MOREIRA

RESFRIAMENTO DE ESPERMATÓFOROS E INSEMINAÇÃO ASSISTIDA EM
CAMARÃO MARINHO *Penaeus vannamei* (Boone, 1931)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Aquicultura.

Aprovado em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Carminda Sandra Brito Salmito Vanderley (Orientadora)
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dra. Larissa Teixeira Nunes (Coorientadora)
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Rodrigo Maggioni
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Mayara Setúbal Oliveira Araújo
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dra. Júlia Turgilio Lopes (Suplente)
Embrapa Pesca e Aquicultura

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de mestrado pelo Programa de Demanda Social.

A Profa. Dra. Carminda Sandra Brito Salmito Vanderley, pela excelente orientação, transmissão de conhecimentos e aceitar os desafios da pesquisa. Assim como a Dra. Larissa Teixeira Nunes pela coorientação e por estar em campo junto comigo executando o trabalho incansavelmente.

Aos participantes da banca examinadora, Professor Rodrigo Maggioni e Doutoras Mayara Setúbal e Júlia Turgilio Lopes pelo tempo dedicado e pelas valiosas colaborações e sugestões que certamente vieram para aperfeiçoar o trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes (LBRP), pelo apoio na realização do trabalho e por contribuírem com a minha imersão no tema de criopreservação.

A LarviFort, por ceder a estrutura física e os animais necessários para a realização das coletas e da inseminação assistida.

Aos meus pais, Francisco Aldaci Moreira, Elissandra Gadelha Moreira, minha irmã Hiara Gadelha Moreira e minha namorada e melhor amiga Beatriz Holanda Saldanha pelo suporte em todos os momentos. A Deus por me presentear com essas pessoas e me capacitar.

RESUMO

O resfriamento de espermátóforos do camarão *Penaeus vannamei* com fins de inseminação assistida pode permitir o trânsito de gametas entre laboratórios de reprodução, facilitando a troca de material genético e o uso de linhagens melhoradas geneticamente. O presente trabalho realizou o resfriamento de espermátóforos de *P. vannamei* a 15 °C durante 24 e 48 horas. Foram avaliados três meios diluidores: Água de Coco em Pó (ACP), Óleo Mineral (OM) e Água do Mar Esterilizada (AME). Foram realizadas análises microscópicas para verificar a viabilidade aparente, através da análise de integridade de membrana com eosina-nigrosina e morfologia espermática. A inseminação assistida foi realizada após os dois períodos de resfriamento. Os tratamentos agiram de forma semelhante com o aumento do tempo. Para viabilidade aparente e morfologia, as porcentagens de células viáveis e morfologicamente normais mantiveram-se acima de 60% e 70%, respectivamente, em todos os tratamentos e em ambos os tempos de resfriamento avaliados. Ao se avaliar os meios diluentes, observaram-se 74,9±9,20, 77,3±9,40 e 78,1±6,35% de células normais nos tratamentos OM, AME e ACP, respectivamente. A maior média da taxa de eclosão foi de 80,67±12,01%, observada no tratamento AME, que foi superior ao observado para o tratamento ACP, com 50,15±20,75%. A taxa de eclosão obtida pelo tratamento OM foi de 71,47±18,83%. Os espermátóforos de *P. vannamei* são capazes de manter boas taxas de viabilidade aparente, morfologia normal e eclosão após 48 horas de estocagem a 15 °C em óleo mineral, água do mar ou ACP®. Sendo a água do mar esterilizada o meio diluente mais eficiente, pois resultou em maior taxa de eclosão após inseminação artificial.

Palavras-chave: Água de coco em pó. Reprodução de camarões. Óleo mineral. Criopreservação de espermátóforos de camarão.

ABSTRACT

The cold storage of spermatophores of the shrimp *Penaeus vannamei* for the purpose of assisted insemination allows the transit of gametes between breeding laboratories, without transporting the animal, facilitating the exchange of genetic material and the use of genetically improved strains. The present work performed the cooling of *P. vannamei* spermatophores to 15 ° C for 24 and 48 hours. Three extenders were evaluated: Coconut Water Powder (ACP), Mineral Oil (OM) and Sterilized Sea Water (AME). Microscopic analyzes were performed to verify the apparent viability, through the analysis of membrane integrity with eosin-nigrosine and sperm morphology. Assisted insemination was performed after both periods of cooling. No statistical interaction was observed between the 24- and 48-hour cooling times. For apparent viability and morphology, the percentages of viable and morphologically normal cells remained above 60% and 70%, respectively, in all treatments and in both evaluated cooling times. When evaluating the extender, 74.9 ± 9.20 , 77.3 ± 9.40 and $78.1 \pm 6.35\%$ of normal cells were observed in the OM, AME and ACP treatments, respectively. The highest average hatching rate was $80.67 \pm 12.01\%$, observed in the AME treatment, which was higher than that observed for the ACP treatment, with $50.15 \pm 20.75\%$. The hatching rate obtained by OM treatment was $71.47 \pm 18.83\%$. The spermatophores of *P. vannamei* are capable of maintaining good rates of apparent viability, normal morphology and hatching after 48 hours of storage at 15 ° C in mineral oil, sea water or ACP[®]. Sterilized sea water is the most efficient diluent, as it resulted in a higher hatching rate after artificial insemination.

Keywords: Powdered coconut water. Shrimp reproduction. Mineral oil. Shrimp spermatophore cryopreservation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVOS	9
3	REVISÃO DE LITERATURA	10
3.1	Características reprodutivas e avaliação da qualidade espermática	10
3.2	A criopreservação seminal	14
3.3	Resfriamento de sêmen de camarão	15
4	MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1	Manejo dos reprodutores	17
4.2	Animais experimentais, coleta de espermátóforos e inseminação assistida	17
4.3	Experimento de resfriamento	18
4.3.1	<i>Análise da integridade de membrana (viabilidade aparente)</i>	19
4.3.2	<i>Análise de morfologia</i>	20
4.3.3	<i>Inseminação assistida</i>	21
4.4	Análises estatísticas	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
6	CONCLUSÃO	28
	REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de camarão marinho *Penaeus vannamei* começou a ser difundido a partir de 1976, quando foi desenvolvido o seu pacote tecnológico de reprodução em cativeiro (FAO, 2006). A partir disso, diversos países passaram a cultivar o crustáceo. A produção total de crustáceos pela aquicultura foi de 9,39 milhões de toneladas, em 2018. Dessa produção, 53%, ou 4,97 milhões de toneladas, foram devidas ao *P. vannamei*, seguido pelo lagostim *Procambarus clarkii*, com 1,7 milhões de toneladas, enquanto as outras espécies de camarão, como o *Penaeus monodon*, não chegaram à marca de 1 milhão de toneladas (FAO, 2020).

Em alguns países têm sido realizados esforços em reprodução seletiva para melhorar a performance produtiva do *P. vannamei* através de maiores taxas de crescimento e sobrevivência (SUI *et al.*, 2015). Além da comercialização de pós-larvas livres de patógenos específicos (SPF) e aplicação de técnicas de biossegurança nas fazendas, a fim de mitigar os impactos das doenças e assegurar a sustentabilidade da indústria (MOSS *et al.*, 2012). Portanto, a introdução de novo material genético às populações brasileiras de camarão marinho, especialmente aquele oriundo de famílias geneticamente melhoradas, através de exocruzamentos pode ser benéfica à carcinicultura brasileira.

Nesse sentido, existem biotecnologias como o resfriamento que permitem o armazenamento e o transporte de gametas de espécies aquáticas, podendo facilitar a troca de material genético entre diferentes laboratórios de reprodução, sem a necessidade do transporte do animal. Além disso, essa técnica permite a estocagem de gametas durante horas ou dias, reduzindo o risco de perda de determinada característica genética com a morte do plantel de reprodutores. Já foram estudados protocolos de resfriamento de células espermáticas de diversas espécies de peixes de interesse comercial, como truta arco-íris (TRIGO *et al.*, 2014), esturjões (SHALIUTINA *et al.*, 2013) e o peixe ornamental Guppy (SUN *et al.*, 2010). Além disso, algumas espécies de crustáceos, como a lagosta *Homarus americanus* (ISHIDA; TALBOT; KOODA-CISCO, 1986), e os camarões *P. monodon* (NIMRAT; SANGNAWAKIJ; VUTHIPHANDCHAI, 2007), *Macrobrachium rosenbergii* (CHOW, 1982) e *P. vannamei* (MORALES-UENO *et al.*, 2016) que também já foram utilizadas em estudos de resfriamento espermático, no entanto os protocolos ainda precisam ser avaliados quanto ao seu efeito sobre a taxa de eclosão através de inseminação assistida.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar espermatozóides de *Penaeus vannamei* submetidos a diferentes soluções de resfriamento em diferentes tempos de armazenagem e realizar inseminação assistida com espermatozóides após resfriamento.

2.2 Objetivos específicos

- a) verificar os efeitos das soluções de resfriamento (ACP[®] água do mar esterilizada e óleo mineral) sobre a qualidade espermática de espermatozóides resfriados durante 24 e 48 horas de armazenagem;
- b) avaliar os efeitos do resfriamento com as soluções ACP[®], água do mar esterilizada e óleo mineral, sobre a taxa de eclosão de *P. vannamei* após inseminação assistida.

3 REVISÃO DE LITERATURA

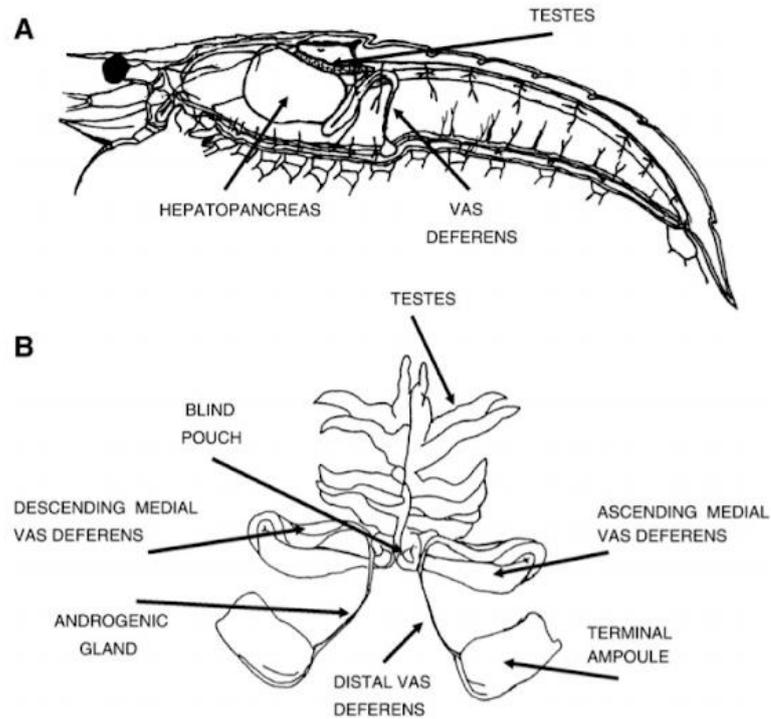
A aquicultura é o cultivo de organismos que possuem ciclo de vida total, ou parcialmente, em meio aquático. Em 2018, a produção aquícola mundial foi de 114,5 milhões de toneladas (FAO, 2020). Essa produção correspondeu a 46% da produção total de pescados (pesca e aquicultura) e, considerando somente o pescado usado na alimentação humana, a aquicultura foi responsável por 52% da produção mundial. O crescimento da aquicultura pode ser notado ao compararmos com o ano 2000, quando a aquicultura correspondia somente a 12,7% da produção mundial de pescados (FAO, 2020). Com a estagnação da produção por captura e o crescimento da população humana, espera-se que a aquicultura continue crescendo para suprir a demanda por pescado.

A produção mundial do camarão marinho, *P. vannamei*, foi de 4,97 milhões de toneladas em 2018, o equivalente a 52,9% do total da produção de crustáceos no mesmo ano, caracterizando esta espécie como a mais produzida mundialmente entre as espécies de crustáceos (FAO, 2020). No Brasil, entre os anos de 2015 e 2016 foi registrada uma queda de aproximadamente 30% da produção nacional (FAO, 2020b), principalmente devido à surtos de enfermidades, como a Síndrome da Mancha Branca. Estima-se que a produção nacional de *P. vannamei* foi de 62 mil toneladas em 2018 (FAO, 2020b).

3.1 Características reprodutivas e avaliação da qualidade espermática

O sucesso do cultivo de *P. vannamei* no mundo foi possível a partir do desenvolvimento do pacote tecnológico de reprodução dessa espécie. Nos camarões peneídeos, os espermatozoides são colados juntos no interior do espermatóforo (LABBE, ROBLES E HERRAEZ, 2013), que consiste em um saco espermático que abriga os espermatozoides. Cada camarão macho possui dois espermatóforos que são produzidos no sistema reprodutivo dos camarões (Figura 01) e armazenados nas ampolas terminais até o momento da cópula ou até a ecdise, quando ocorre a renovação dos espermatóforos.

Figura 01 – Esquema representativo da anatomia do sistema reprodutivo masculino de *Penaeus vannamei*.



Fonte: Alfaro-Montoya (2010).

Nestes camarões, durante o acasalamento, o macho deposita o espermátóforo no téllico da fêmea. O téllico é uma região modificada do esterno das fêmeas para receber o espermátóforo e armazená-lo até o momento da desova, quando ocorre a fertilização na água. Os camarões peneídeos são divididos em espécies de téllico aberto e de téllico fechado. Como o *P. vannamei* é um camarão de téllico aberto, o espermátóforo é aderido à superfície do téllico, onde permanece durante cerca de 4 a 6 horas até a desova (MISAMORE; BROWDY, 1996).

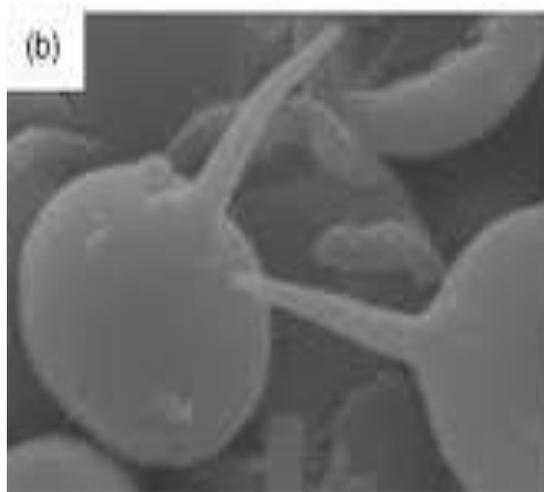
A capacitação dos espermatozoides de *P. vannamei* possivelmente acontece quando o espermátóforo está aderido ao téllico, como sugerem Aungsuchawan, Browdy e Withyachumnarnkul (2010), ao reportarem diferenças morfológicas e bioquímicas entre os gametas extraídos do espermátóforo na ampola terminal dos machos e os extraídos do téllico das fêmeas 4 horas após a cópula.

A avaliação da qualidade espermática pode ser realizada através da motilidade dos espermatozoides em diversas espécies animais. No entanto, não é possível avaliar a viabilidade do sêmen através da motilidade em crustáceos decápodes, pois os espermatozoides destes animais são aflagelados e não móveis. Assim, a avaliação da qualidade do sêmen pós descongelamento ou aquecimento, é normalmente feita através da análise de sobrevivência, ou

integridade de membrana, gerando um resultado denominado viabilidade aparente (GWO, 2000).

Outra diferença na avaliação da qualidade do sêmen de camarão, é quanto a morfologia das células espermáticas. Os espermatozoides dos camarões (Figura 02) apresentam cabeça e um espinho, portanto, não possuem peça intermediária e flagelo, como acontece com a maioria das espécies de vertebrados estudadas (GWO, 2000). Dessa forma, são feitas avaliações de morfologia em espermatozoides de camarão para mensurar a qualidade seminal.

Figura 02 – Microscopia eletrônica de espermatozoide de *P. vannamei*.



Fonte: Aungsuchawan, Browdy e Withyachumnarnkul (2010).

A sobrevivência dos gametas pode ser avaliada por microscopia óptica, através da coloração com eosina-nigrosina, ou por citometria de fluxo (LEZCANO; GRANJA; SALAZAR, 2004). Ambas as técnicas avaliam a integridade de membrana, gerando um resultado de viabilidade aparente. Há ainda a técnica de avaliação da integridade de membrana por microscopia de fluorescência (SILVA *et al.*, 2015). No entanto, a avaliação utilizando eosina e nigrosina é a mais fácil de ser utilizada e menos dispendiosa, sendo a técnica mais difundida em trabalhos de avaliação de qualidade espermática.

A morfologia dos espermatozoides de camarão pode ser feita por microscopia óptica (UBERTI *et al.*, 2014) ou por contraste de fase (BRAY; LAWRENCE, 1998), avaliando-se a presença ou ausência do espinho e o formato arredondado da cabeça. Essa análise gera um resultado que expressa as porcentagens de células morfologicamente normais e anormais na amostra.

No entanto, estas análises de qualidade espermática podem não ser suficientes para atestar a viabilidade dos espermatozoides após armazenagem refrigerada, por não verificarem

a capacidade fecundante das células espermáticas. Nesse sentido, a inseminação assistida é imprescindível como técnica para a avaliação de espermátóforos, juntamente com as análises previamente citadas para compor resultados mais completos e fidedignos da qualidade espermática.

Ao realizarem o congelamento de espermátóforos de *P. vannamei*, Castelo-Branco *et al.* (2015) observaram altas taxas de viabilidade aparente após descongelamento. No entanto, ao realizarem inseminação assistida com estes espermátóforos, os autores relataram que não houve eclosão em nenhum dos tratamentos citados. Este trabalho indica que a avaliação somente através da viabilidade aparente ou morfologia não garantem que os espermátóforos serão capazes de fertilizar os ovos e desenvolverem-se para náuplios.

Os autores Arce, Moss e Argue (2000) descreveram uma técnica de inseminação assistida que pode ser resumida em escolher fêmeas com completo desenvolvimento ovariano (Figura 03) e machos com espermátóforos maduro, extrair os dois espermátóforos por leve pressão manual, segurar cuidadosamente a fêmea madura, direcionando os pereópodes (quarto e quinto pares) contrários ao abdômen, de modo a expor o seu télico e secando com papel toalha, depositar os espermátóforos sobre o télico, com cuidado para posicioná-los corretamente, depois voltando os pereópodes para a posição normal, assim prendendo o espermátóforo no local. Os autores ainda sugerem que, caso seja usado apenas um espermátóforo para cada fêmea, a massa espermática seja extraída antes de colocá-lo sobre o télico. Essa extração pode ser feita pressionando o espermátóforo entre os dedos polegar e indicador, da base para o topo do espermátóforo, rompendo a estrutura externa e liberando a massa espermática.

Figura 03 – Fêmea de *P. vannamei* sexualmente madura com alto desenvolvimento ovariano.



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

3.2 A criopreservação seminal

Criopreservação consiste no uso de baixas temperaturas para conservar células vivas funcionais e viáveis (PEGG, 2009). Há dois tipos de criopreservação, a congelação e o resfriamento. A congelação seminal é a preservação de gametas masculinos a longo prazo através da conservação em nitrogênio líquido (-196°C; ALMEIDA-MONTEIRO *et al.*, 2017). As células espermáticas são mais fáceis de criopreservar do que embriões e oócitos, por serem menores e menos compartimentalizadas (LABBE; ROBLES; HERRAEZ, 2013).

De acordo com Labbe, Robles e Herraез (2013), a criopreservação de espermatozoides permite o transporte de sêmen ao redor do mundo, facilita o gerenciamento dos machos, permite aumentar o período de produção de formas jovens, dá suporte a programas de melhoramento genético e permite a manutenção do sêmen de indivíduos representativos durante várias gerações, mesmo que o animal seja perdido, como quando os animais são capturados na natureza, podendo morrer devido aos métodos de pescaria. Essa técnica pode auxiliar na conservação de estoques de animais aquáticos selvagens, evitando a perda de diversidade genética de espécies nativas e mantendo uma fonte de material genético destas espécies, que podem ser úteis à aquicultura no futuro (CLOUD; PATTON, 2009).

Diferentemente da congelação, o resfriamento, enquanto técnica de criopreservação, pode ser útil para usos de curto prazo, como inseminação assistida (NIMRAT *et al.*, 2006) e transporte. Para isso, utilizam-se temperaturas acima do ponto de congelação (BOBE; LABBE; 2009) e a redução até tais temperaturas, pode ser feita através da inserção das amostras em caixas de isopor contendo gelo (MORALES-UENO *et al.*, 2016), ou por meio de refrigeradores automáticos (BRAY; LAWRENCE, 1998). Os protocolos de resfriamento visam preservar a integridade e qualidade espermática durante vários dias, semanas ou até meses (GALLEGO; ASTURIANO, 2018). Tais gametas, devidamente preservados, podem ser utilizados em programas de melhoramento genético, possibilitando o envio de material genético de um laboratório de reprodução para outro, sem a necessidade de transportar o animal.

Viveiros, Taffarel e Leal (2014) utilizaram um refrigerador para armazenar sêmen de peixe (*Prochilodus lineatus*) e observaram bons resultados de qualidade seminal por até dois dias. Parodi *et al.* (2017) observaram motilidade e mortalidade semelhantes ao observado em sêmen fresco de salmão durante três dias de resfriamento. Apesar do resfriamento ser avaliado para curtos períodos de tempo, Ishida, Talbot e Kooda-Cisco (1986) observaram espermatozoides morfológicamente normais e hábeis a reação acrossômica por até 289 dias de estocagem refrigerada de espermatóforos de lagostas do gênero *Homarus*.

De acordo com Bobe e Labbé (2009), o resfriamento de gametas torna o metabolismo celular mais lento. Assim, para estes autores, é importante que, no reaquecimento, o meio de resfriamento ofereça concentração adequada de oxigênio, seja capaz de evitar alterações deletérias de pH, podendo ainda conter substratos energéticos para o metabolismo celular e confira equilíbrio osmótico para assegurar o funcionamento do metabolismo e a manutenção das funções das células. Além disso, a congelação e o resfriamento podem provocar danos as células, como o rompimento da membrana plasmática, diminuindo o tempo de vida dos espermatozoides e prejudicando seu potencial fecundante, sendo necessário o desenvolvimento de um diluente capaz de manter a viabilidade espermática por mais tempo (BARROS; TONIOLLI, 2011). Assim, o uso de diluentes adequados no resfriamento de espermátóforos de camarão é essencial para a manutenção do potencial fecundante dos espermatozoides após o período de armazenagem refrigerada.

Nesse sentido, já foram avaliadas soluções salinas, tampão fosfato, soluções salinas livres de cálcio, soluções de NaCl, solução de ringer e óleo mineral em trabalhos com espermatozoides de camarão (BRAY; LAWRENCE, 1998; NIMRAT *et al.*, 2006; MORALES-UENO *et al.*, 2016). O meio diluidor água de coco em pó (ACP) apresentou resultados promissores na conservação espermática para algumas espécies de peixes (CARVALHO *et al.*, 2014). Esse meio diluidor é composto por sais, proteínas, açúcares, vitaminas, lipídeos, eletrólitos e indutores de divisão celular, podendo ser benéfica a conservação de espermatozoides (LEITE *et al.*, 2011). No entanto, a ACP ainda não havia sido testada em nenhuma espécie de crustáceo.

3.3 Resfriamento de sêmen de camarão

O resfriamento é uma técnica promissora para estocagem de espermátóforos em curto prazo, sob baixas temperaturas para fins de inseminação assistida (NIMRAT; VUTHIPHANDCHAI, 2008). Na literatura estão disponíveis trabalhos de resfriamento com algumas espécies de camarão, como *P. monodon* (FENG *et al.*, 2018), *Penaeus merguensis* (NIMRAT *et al.*, 2020) e *M. rosenbergii* (CHOW, 1982). Porém, ainda são poucos estudos, se comparado com outros grupos animais. Quando se trata de trabalhos com espermatozoides de *P. vannamei* foram encontrados disponíveis na literatura, através de pesquisa online, apenas 4 trabalhos em que foi realizado o resfriamento (MORALES-UENO *et al.*, 2016; CASTELO-BRANCO *et al.*, 2016; NIMRAT *et al.*, 2006; BRAY e LAWRENCE, 1998).

Para *P. vannamei*, os autores Bray e Lawrence (1998) observaram os efeitos do resfriamento (15 °C) de espermátóforos em água do mar e solução salina sem cálcio, em diferentes períodos de tempo sobre a contagem total e de células anormais. Os resultados obtidos não apresentam diferenças significativas entre as soluções testadas e os tempos de estocagem. Nimrat *et al.* (2006) avaliaram diferentes meios diluentes para a estocagem refrigerada (2-4 °C) de espermátóforos durante 35 dias e concluíram que o óleo mineral com 0,1% de antibiótico é capaz de manter a viabilidade aparente do sêmen em 69,5%. Já Morales-Ueno *et al.* (2016), alcançaram baixas porcentagens de células inviáveis após transporte de espermátóforos resfriados a cerca de 14 °C, utilizando solução salina com antibiótico, por 26 e 32 horas. Castelo-Branco *et al.* (2016) avaliaram a qualidade espermática de espermátóforos retirados de camarões mortos armazenados sob diferentes temperaturas e encontraram os melhores resultados (69%) quando os espécimes foram armazenados a 4 °C durante 96 horas.

Todos os trabalhos citados envolvendo o resfriamento de espermátóforos de *P. vannamei* realizaram somente testes *in vitro* para avaliar o sucesso dos protocolos adotados. Porém, faz-se necessário a avaliação *in vivo* da influência do resfriamento nos espermatozoides, através de resultados de inseminação assistida, pois se os espermatozoides, mesmo após o resfriamento, continuarem aptos a fertilização, gerando embriões viáveis e resultando em eclosão, tais protocolos de estocagem refrigerada possibilitam o transporte de espermátóforos com fins de inseminação assistida, podendo ser colocados em prática por laboratórios de produção de pós-larvas e afins.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido pelo Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes (LBRP), da Universidade Estadual do Ceará em parceria com o Laboratório Comercial de Produção de Pós-larvas de Camarão LarviFort, em Itarema, Ceará.

4.1 Manejo dos reprodutores

Os animais utilizados no trabalho pertencem ao setor de maturação do laboratório comercial LarviFort, em Itarema, Ceará e foram mantidos nas mesmas condições usualmente empregadas no laboratório, que são: pH de 8,0; salinidade de 36 g L⁻¹; temperatura da água de 28°C; fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro; mantidos entre 240 e 250 animais por tanques de 15 m³ e alimentados com ração comercial e alimento congelado. Machos e fêmeas disponibilizados pelo laboratório foram utilizados para a extrusão dos espermatozóides e inseminação artificial.

4.2 Animais experimentais, coleta de espermatozóides e inseminação assistida

Foram utilizados 36 camarões machos sexualmente maduros para a coleta de espermatozóides, que foram obtidos a partir de leve pressão manual sobre a base do quinto par de pereópodes (Figura 04). De cada camarão, o espermatozóide do lado direito foi destinado à inseminação artificial após o período de resfriamento, enquanto o do lado esquerdo foi utilizado nas análises de qualidade espermática após o resfriamento. Após a coleta, os camarões retornaram para os tanques do setor de maturação do laboratório.

Figura 04 – Coleta de espermatozóides realizada no experimento.



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Para realização de inseminação artificial, foram utilizadas 36 fêmeas sexualmente maduras, que foram mantidas nas mesmas condições que os machos. As fêmeas inseminadas artificialmente foram colocadas em tanques individuais (Figura 05) até que foram observadas as desovas e foram devolvidas aos tanques do setor de maturação do laboratório Larvifort.

Figura 05 – Tanques de desova individual (A) e tanques do setor de maturação do laboratório de produção de pós-larvas (B).



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

4.3 Experimento de resfriamento

Espermatóforos recém coletados foram imersos em tubos eppendorf de 2 mL contendo as seguintes soluções diluidoras: ACP[®] (osmolaridade: 800 mOsm), água do mar filtrada e esterilizada (autoclave 127°C por 90 minutos) e óleo mineral (Mineral oil – light oil (neat), BioReagent, suitable for mouse embryo cell culture, Sigma-Aldrich). O resfriamento foi realizado na temperatura de 15 °C. Para isso, as amostras foram inseridas em uma caixa térmica de isopor contendo gelo. A quantidade de gelo foi adequada para que a temperatura permanecesse em torno de 15 °C e um termômetro digital foi utilizado para o monitoramento da temperatura dentro da caixa de isopor durante todo o período de estocagem para possíveis ajustes na quantidade de gelo a fim de manter a temperatura constante.

Assim, foram formados três tratamentos, com cinco repetições, de acordo com as soluções diluidoras. Sendo OM, o tratamento com uso de óleo mineral; ACP, com uso da água de coco em pó comercial ACP[®] e AME, com água do mar esterilizada. Cada tratamento passou

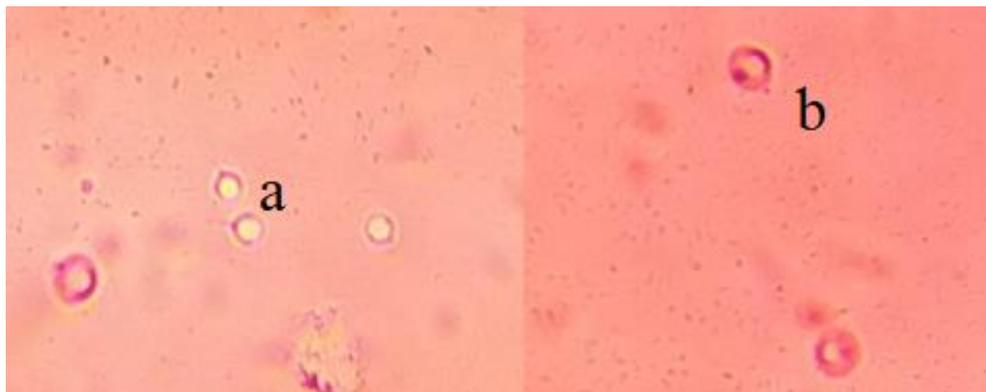
por avaliações de qualidade espermática e inseminação artificial 24 horas e 48 horas após o início do resfriamento. Somente os espermátóforos frescos, que foram o grupo controle, foram coletados no momento de realização das análises e da inseminação artificial. Análises de integridade de membrana, morfologia espermática e inseminação artificial foram realizadas seguindo os procedimentos citados a seguir.

4.3.1 Análise de integridade de membrana (viabilidade aparente)

Antes da realização das análises em microscópio, foi preparada a suspensão espermática. Para isso, os espermátóforos foram retirados do tubo ependorff com o auxílio de uma pinça e colocados sobre placa de petri. Foi utilizada uma lâmina bisturi para corte do espermátóforo em pequenos pedaços. Esses pedaços foram colocados novamente em um tubo ependorff de 1,8 mL contendo 500 μ L de água do mar esterilizada e agitados manualmente para a liberação dos espermatozoides na água, realizando assim a suspensão espermática.

A avaliação da integridade de membrana foi realizada pela adaptação da metodologia descrita por Jeyalectumie e Subramoniam (1989). Em resumo, 10 μ L de suspensão espermática foram acrescidos de 10 μ L de eosina e de 5 μ L de nigrosina. Após 10 minutos de repouso, 5 μ L dessa mistura foram colocados entre lâmina e lamínula. As lâminas confeccionadas foram submetidas à observação em microscopia de luz (400x). As células rosadas ou arroxeadas indicaram que houve penetração de eosina, apontando que houve rompimento na membrana plasmática. Enquanto as células que permaneceram com o interior translúcido, em contraste com o fundo corado por nigrosina, foram consideradas com membranas íntegras (Figura 06). Para cálculo da taxa de viabilidade aparente foram contadas no mínimo 100 células em cada lâmina, em 5 lâminas para cada tratamento, totalizando 30 lâminas no experimento.

Figura 06 – Microscopia óptica (x400) de espermatozoides de *P. vannamei* em análise de integridade de membrana; a = espermatozoide com membrana íntegra; b = espermatozoide com membrana rompida.

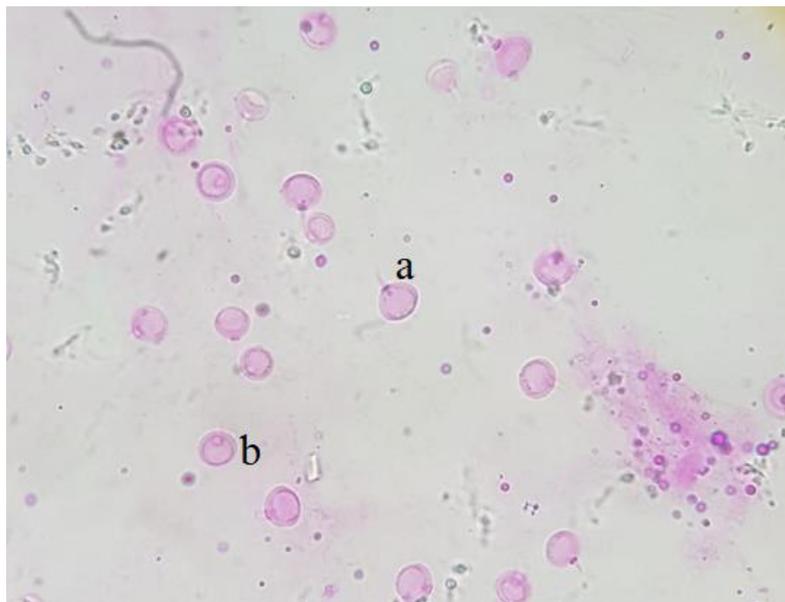


Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

4.3.2 Análise de morfologia

Foi realizada avaliação morfológica das células espermáticas com corante rosa bengala em microscopia de luz (400x) para quantificar a porcentagem de anormalidades. Adaptando o protocolo utilizado por Lopes (2019), onde uma alíquota de suspensão espermática (preparada como descrito anteriormente) foi fixada em solução formol 4% (proporção 1:10), então a suspensão espermática fixada foi corada com rosa bengala, de acordo com os seguintes passos: uma alíquota de 50 μ L de suspensão espermática foi acrescida de 3 μ L do corante. Depois, a solução de suspensão espermática e corante ficou em repouso por cerca de 10 minutos para penetração do corante nas células. Então, foi confeccionada uma lâmina por deposição de lamínula para cada amostra. Células contendo espinho acrossomal e cabeça arredondada foram consideradas normais, enquanto aquelas com espinho ausente, ou formato irregular foram consideradas anormais (Figura 07; LEZCANO; GRANJA; SALAZAR, 2004). Foram contadas 100 células em cada lâmina.

Figura 07 – Microscopia óptica (x400) de espermatozoides de *P. vannamei* em análise de morfologia; a = espermatozoide morfologicamente normal, com espinho acrossomal presente; b = espermatozoide anormal.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

4.3.3 Inseminação Assistida

A inseminação assistida foi realizada de acordo com o método rotineiramente utilizado no setor de maturação do laboratório LarviFort. Este método é muito semelhante aquele descrito por Arce, Moss e Argue (2000). Em resumo, cada espermátóforo destinado a inseminação, após o resfriamento, foi pressionado em sua base para liberação da massa espermática e colocado sobre o téllico de fêmeas maduras (Figura 08). Para isso, uma pessoa segurou a fêmea com as duas mãos, afastando os pereópodes e outra pessoa depositou a massa espermática sobre o téllico com o auxílio de uma pinça. Foi utilizado um espermátóforo para cada fêmea. Depois disso, as fêmeas inseminadas foram colocadas em tanques experimentais de desova individual, de aproximadamente 100 L, onde ficaram até o momento da desova.

Figura 08 – Fêmea de *Penaeus vannamei* com massa espermática aderida ao tégico após inseminação assistida.



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Após a desova, cerca de cinco horas depois da inseminação artificial, as fêmeas foram removidas e os ovos foram concentrados em porções menores de água, com o auxílio de um recipiente contendo uma malha de filtragem (Figura 09), para permitir a passagem da água e reter os ovos. Além disso, mais água corrente foi adicionada, passando pelos recipientes para retirada de possíveis impurezas da água de onde foi realizada a desova, por conseguinte, lavando os ovos. Após esse procedimento, os ovos foram colocados em recipientes de 14 L (Figura 07) com aeração, através de uma mangueira de aeração acoplada em uma pedra porosa em cada tanque, acionada para favorecer a oxigenação constante e a homogeneização dos ovos na coluna de água. Toda a água utilizada nos tanques de desova e nos recipientes para eclosão apresentava pH, salinidade e temperatura semelhantes às águas do setor de maturação.

Figura 09 – Recipiente com malha de filtragem para lavagem e concentração dos ovos (A) e recipientes de eclosão (B).



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Para calcular a quantidade de ovos após as desovas, duas alíquotas de 5 mL foram retiradas de cada tanque. Os ovos foram contados a olho nu, em placas de *petri* colocadas sobre um fundo escuro. Quando as duas contagens eram muito diferentes entre si, as amostras eram devolvidas ao recipiente e duas novas amostras eram retiradas. A partir das duas contagens, foi calculada a média aritmética e a estimativa do total de ovos em cada tanque, multiplicando a média de ovos em 5 mL pelo volume total do recipiente (14 L).

Cerca de 16 horas depois da inseminação, foi observada a ocorrência de eclosão e a foi realizada a contagem dos náuplios para cálculo da taxa de eclosão. Seguiu-se o mesmo protocolo de contagem utilizado para estimar a quantidade de ovos. No entanto, para a taxa de eclosão contaram-se a quantidade de náuplios. Uma vez que foi estimada a quantidade de náuplios em cada tanque, calculou-se a taxa de eclosão com base na quantidade de ovos contada anteriormente, seguindo a fórmula:

$$\text{Taxa de Eclosão} = (\text{Número total de náuplios} \div \text{Número total de ovos}) \times 100$$

4.4 Análises estatísticas

Os dados passaram pelo teste de Shapiro-Wilk para investigar a distribuição normal dos resíduos e a homoscedasticidade, respectivamente. Depois, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), realizada no software SAS PROC GLM (2002). A análise seguiu o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 3×2 (diluentes \times tempo de estocagem). Quando observada diferença estatística, foi aplicado o teste de Duncan para comparar as médias. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de médias, a um nível de significância de 5% ($P < 0.05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os machos utilizados nesse experimento apresentaram espermátóforos com espermatozoides viáveis e capazes de fecundação, sendo a viabilidade espermática no sêmen fresco de $73,75 \pm 4,72\%$ e pós inseminação a taxa de eclosão foi de $72,07 \pm 19,29\%$.

De acordo com as análises estatísticas, não houve interação tempo/diluidor em nenhum dos tratamentos, ou seja, as variáveis tempo e diluidor não tem relação entre si. O que significa que os três tratamentos responderam de forma semelhante ao aumento de tempo de estocagem. Dessa forma, para a comparação estatística das médias, foram elaboradas tabelas considerando somente uma fonte de variação em cada.

Quando os dados são comparados considerando todos os tratamentos, ou seja, independentes do meio diluidor (Tabela 01), as porcentagens de células com morfologicamente normais não diferiram entre os dois tempos de estocagem. O mesmo pode ser observado para a viabilidade aparente, não apresentando diferenças significativas entre as médias dos dois tempos de resfriamento.

Tabela 01 – Qualidade espermática em espermátóforos de *Penaeus vannamei* e taxa de eclosão independente do meio diluidor, após 24 e 48 horas de estocagem a 15 °C.

	Tempo de estocagem a 15 °C	
	24 horas	48 horas
Morfologia normal (%)	$76,53 \pm 6,24^a$	$77 \pm 10,11^a$
Viabilidade aparente (%)	$64,53 \pm 13,96^a$	$62,30 \pm 15,05^a$
Eclosão (%)	$78,29 \pm 14,42^a$	$57,71 \pm 22,01^b$

Letras iguais na mesma linha indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos, enquanto letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa.

No entanto, as taxas de eclosão observadas nos tratamentos após 48 horas de estocagem foram significativamente inferiores aquelas resultantes dos tratamentos após 24 horas. Esses resultados indicam que, de modo geral, mesmo não exercendo efeito sobre a morfologia e a viabilidade aparente, o aumento do tempo de estocagem refrigerada foi capaz de reduzir a taxa de eclosão após inseminação assistida.

Quando foram comparados os resultados de taxa de eclosão entre os tratamentos ao se considerar todo o período de estudo, ou seja, independente do tempo, foram observadas diferenças estatísticas, como mostra a Tabela 02.

Tabela 02 – Qualidade espermática e taxa de eclosão independente do tempo de resfriamento, utilizando as soluções óleo mineral (OM), água de coco em pó (ACP) e água do mar esterilizada (AME) em espermatóforos de *Penaeus vannamei*.

	Tratamento		
	OM	ACP	AME
Morfologia normal (%)	74,9±9,2 ^a	77,3±9,4 ^a	78,1±6,3 ^a
Viabilidade aparente (%)	67±15,46 ^a	62,4±19 ^a	60,9±10,5 ^a
Eclosão (%)	71,47±18,83 ^{ab}	50,15±20,75 ^b	80,67±12,01 ^a

Letras iguais na mesma linha indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos, enquanto letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa.

Os resultados das análises de morfologia não diferiram entre si para os três tratamentos, demonstrando que o resfriamento com os três meios diluentes foi igualmente eficiente para a manutenção da morfologia normal das células espermáticas durante 48 horas de armazenagem, mantendo a porcentagem de células elevada. Estes resultados corroboram aqueles obtidos por Bray e Lawrence (1998), que encontraram porcentagens satisfatórias de espermatozoides morfolologicamente normais (77,2%) após 36 horas de estocagem à 15°C utilizando água do mar.

A viabilidade aparente de OM foi de 67±15,46%, considerando todo o período de estudo (Tabela 02). Enquanto que os meios diluentes água do mar esterilizada (AME) e ACP, resultaram em 60,90±10,56% e 62,40±19,05% de viabilidade aparente, respectivamente. No entanto, não houve diferença significativa entre os resultados de viabilidade aparente obtidos nos três tratamentos avaliados. Morales-Ueno *et al.* (2016) observaram alta porcentagem de células inviáveis (81±7%) após 36 horas de resfriamento a 14°C em solução salina, diferindo do que foi observado no presente estudo, que apresentou maior porcentagem de células viáveis após um tempo maior de resfriamento, em temperatura semelhante, demonstrando uma melhor adequação do protocolo do presente estudo.

Quando se trata do uso de óleo mineral, Nimrat *et al.* (2006) obtiveram 55,7% de viabilidade aparente após 35 dias de estocagem refrigerada (2-4 °C), também com o uso de óleo mineral. Nimrat *et al.* (2020), avaliando espermatozoides de outra espécie de camarão peneídeo

(*P. merguensis*), encontraram taxas de viabilidade aparente (>60%) semelhantes às encontradas no presente estudo, utilizando óleo mineral. No entanto, estes autores realizaram o resfriamento de espermatozóides de camarão banana por até 28 dias. Tais achados indicam que o óleo mineral pode ser capaz de prolongar o tempo de armazenagem refrigerada. Assim, trabalhos futuros podem realizar avaliações com maior espaço de tempo para espermatozóides resfriados de *P. vannamei*. No presente estudo houve uma tendência de o óleo mineral ser eficiente na manutenção dos espermatozóides em resfriamento à 15°C.

O óleo mineral consiste em uma mistura de hidrocarbonetos líquidos refinados e é um derivado do petróleo. Wale e Gardner (2015) afirmam que o óleo mineral reduz flutuações de pH e temperatura, retarda a evaporação e estabiliza a osmolaridade, quando utilizado em cultura de embriões humanos de fertilização *in vitro*. Essas propriedades podem ter contribuído para a manutenção das taxas de integridade de membrana, morfologia normal e eclosão.

Como não houve interação entre diluidor e tempo, de modo geral, a diferença de 24 horas entre os dois tempos de armazenagem refrigerada no presente estudo não exerceu efeito significativo sobre os resultados de qualidade espermática. No entanto, a taxa de eclosão observada para o tratamento AME, foi superior aos demais tratamentos, quando se considerou todo o período de armazenagem.

A maior média da taxa de eclosão foi de 80,67±12,01%, observada em AME, sendo superior ao observado para o tratamento ACP, com 50,15±20,75% (Tabela 02). No entanto, o resultado obtido pelo tratamento OM foi de 71,47±18,83% e não diferiu estatisticamente dos obtidos para ACP e AME, aproximando-se da taxa de eclosão obtida com os espermatozóides frescos, que foi de 72,07±19,29%.

Apesar da taxa de eclosão obtida no tratamento com uso de ACP[®] ter sido a menor, estes resultados foram maiores do que os observados por Peralta-Martínez *et al* (2019), que realizaram inseminação assistida com espermatozóides frescos de *P. vannamei* e obtiveram uma taxa de eclosão média de 41,1±27,9%. A média da taxa de eclosão observada por Caballero-Zamora *et al* (2013) foi de 21,76%, também menor do que os resultados obtidos no tratamento ACP do presente estudo.

Ren *et al* (2020) obtiveram taxa de eclosão média de 84,6±0,23% em cópula natural, demonstrando que a taxa de eclosão obtida no tratamento AME foi satisfatória ao se levar em consideração que os espermatozóides, no presente estudo, foram submetidos ao estresse do resfriamento por até 48 horas e manipulados para a realização da inseminação assistida, o que se acredita causar injúrias às células espermáticas.

Não foram encontrados registros de trabalhos de resfriamento de espermátóforos de *P. vannamei* em que foi realizada inseminação assistida. Isso pode acontecer devido a necessidade de estrutura física para manutenção das fêmeas e de domínio técnico sobre a inseminação, além de maior demanda de tempo para realização dos trabalhos. Porém, Nimrat, Sangnawakij e Vuthiphandchai (2007) armazenaram espermátóforos de *P. monodon* a 2-4°C durante 7-8 dias em óleo mineral e obtiveram uma taxa de eclosão de 87,6±1,2%, indicando que é possível encontrar bons resultados em tempos de estocagem ainda maiores do que os avaliados no presente estudo. Apesar disso, é importante ressaltar a relevância deste trabalho, pioneiro, pois com o domínio técnico da conservação de espermátóforos de *P. vannamei*, poderá se alavancar a troca de material genético entre criadouros, para inseminação assistida, sem a necessidade de transporte de animais, o que poderia levar ao óbito dos mesmos, ou disseminar doenças entre criatórios de camarão.

Tabela 01 - Qualidade espermática e taxa de eclosão em *Penaeus vannamei* com espermátóforos resfriados por 24 e 48 horas em soluções de óleo mineral (OM), água de coco em pó (ACP) e água do mar esterilizada (AME).

Tempo	Parâmetro	OM	ACP	AME
24h	Morfologia	72,0±4,3	75,4±5,3	82,2±4,7
	Viabilidade	70,0±15,4	62,4±19,0	61,2±4,9
	Eclosão	86,83±3,98	63,89±18,06	84,16±1,06
48h	Morfologia	77,8±12,3	79,2±12,7	74,0±5,1
	Viabilidade	64,0±16,6		60,6±15,0
	Eclosão	59,18±16,5	36,42±13,24	77,15±17,41

Todos os valores são expressos em porcentagens (%).

Os resultados de viabilidade aparente do tratamento ACP em 48h não foram obtidos por perda das amostras.

A viabilidade aparente média dos espermátóforos frescos foi de 73,75±4,72%. Para viabilidade aparente e morfologia, as porcentagens de células viáveis (Figura 02) e morfologicamente normais (Figura 03) mantiveram-se acima de 60% e 70%, respectivamente, em todos os tratamentos e em ambos os tempos de resfriamento avaliados. Enquanto que as taxas de eclosão demonstraram uma tendência de redução com o aumento do tempo.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, foi possível observar que os espermatóforos de *P. vannamei* são capazes de manter boas taxas de viabilidade aparente, morfologia normal e eclosão após 48 horas de estocagem a 15 °C em óleo mineral, água do mar ou ACP®. A água de coco em pó foi menos eficiente que a água do mar esterilizada, pois resultou em menor taxa de eclosão após inseminação artificial. Levando em consideração que a água do mar esterilizada é um diluente de aquisição mais fácil, conclui-se que é o meio mais recomendado pelo presente estudo para o resfriamento de espermatóforos a 15°C por até 48 horas.

Os três diluentes foram capazes de manter a qualidade espermática durante os tempos de armazenagem de 24 e 48 horas, sem diferenças estatísticas entre eles. Para a eclosão, mesmo que após 48 horas os resultados tenham diminuído, ainda se mantiveram resultados satisfatórios. Ensaio de inseminação assistida com espermatóforos resfriados por períodos maiores de tempo são necessários para verificar até quando os meios diluidores avaliados são capazes de manter resultados satisfatórios de taxa de eclosão.

Os três diluentes foram capazes de manter a qualidade espermática durante os tempos de armazenagem refrigerada de 24 e 48 horas, sem diferenças significativas entre eles. Somente a taxa de eclosão apresentou pequena diferença entre tratamentos. Dessa forma, a realização de ensaios com inseminação assistida utilizando espermatóforos resfriados por períodos maiores de tempo se faz necessária para a melhor compreensão dos efeitos desses meios diluidores sobre a taxa de eclosão.

Destaca-se que este foi o primeiro trabalho que realizou inseminação assistida com espermatóforos resfriados de *P. vannamei* obtendo boas taxas de eclosão, assemelhando-se a utilizada com espermatóforos frescos, demonstrando o promissor potencial desta prática na carcinicultura.

REFERÊNCIAS

- ARCE, Steve M.; MOSS, Shaun M.; ARGUE, Brad J. **ARTIFICIAL INSEMINATION AND SPAWNING OF PACIFIC WHITE SHRIMP *Litopenaeus vannamei***: implications for a selective breeding program. [s.l.]: UJRN Technical Report, 2000. 4 p.
- ALMEIDA-MONTEIRO, Priscila Silva de *et al.* Influence of vitamins C and E on the quality of cryopreserved semen *Prochilodus brevis* (Prochilodontidae, Teleostei). **Semina: Ciências Agrárias**, [s.l.], v. 38, n. 41, p.2669-2680, 25 ago. 2017.
- AUNGSUCHAWAN, Sirinda; BROWDY, Craig L; WITHYACHUMNARNKUL, Boonsirm. Sperm capacitation of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research**, [s.l.], v. 42, n. 2, p.188-195, 11 nov. 2010.
- BARROS, T. B.; TONIOLLI, R. Uso potencial da água de coco na tecnologia de sêmen. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v. 35, n. 4, p. 400-407, dez. 2011.
- BOBE, Julien; LABBÉ, Catherine. CHILLED STORAGE OF SPERM AND EGGS. In: CABRITA, Elsa; ROBLES, Vanessa; HERRÁEZ, Paz. **Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species**. New York: Crc Press, 2009. Cap. 6. p. 219-235.
- 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**, Amsterdam, v. 160, n. 1-2, p.63-67, jan. 1998
- CABALLERO-ZAMORA, Alejandra *et al.* Genetic parameters for spawning and growth traits in the Pacific white shrimp (*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*). **Aquaculture Research**, [s.l.], v. 46, n. 4, p. 833-839, 12 jul. 2013.
- CARVALHO, Maria Audália Marques de *et al.* Coconut water as extender for sperm of freshwater fish with external fertilization. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, [s.l.], v. 8, n. 4, p. 203-222, dez. 2014.
- CASTELO-BRANCO, Thaís *et al.* Cadaveric sperm viability in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research**, [s.l.], v. 47, n. 10, p.3350-3351, 28 abr. 2016.
- CHOW, Seinen. Artificial insemination using preserved spermatophores in the palaemonid shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. **Nippon Suisan Gakkaishi**, [s.l.], v. 48, n. 12, p.1693-1695, 1982.
- CLOUD, Joseph; PATTON, S. BASIC PRINCIPLES OF FISH SPERMATOZOA CRYOPRESERVATION. In: CABRITA, Elsa; ROBLES, Vanessa; HERRÁEZ, Paz. **Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species**. New York: Crc Press, 2009. Cap. 7. p. 237-250.
- FAO, 2006. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Penaeus vannamei*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Briggs, M. In: **FAO Fisheries and**

Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 7 April 2006.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020**. Sustainability in action. Rome, 2020.

FAO. 2020b. FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2018/FAO annuaire. Statistiques des pêches et de l'aquaculture 2018/FAO anuario. **Estadísticas de pesca y acuicultura 2018**. Rome.

FENG, Tianyi *et al.* Sperm chromatin dispersion test (SCDt) for the assessment of sperm DNA fragmentation in black tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, [s.l.], v. 491, p.281-288, abr. 2018.

GALLEGO, V.; ASTURIANO, J. F. Fish sperm motility assessment as a tool for aquaculture research: a historical approach. **Reviews in Aquaculture**, [s.l.], v. 11, n. 3, p. 697-724, 17 maio 2018.

GWO, J. C. Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review. **Aquaculture Research**, [s.l.], v. 31, n. 3, p.259-271, mar. 2000.

ISHIDA, T; TALBOT, P; KOODA-CISCO, M. Technique for the long-term storage of lobster (*Homarus*) spermatophores. **Gamete Research**, [s.l.], v. 14, n. 3, p. 183-195, jul. 1986.

JEYALECTUMIE, C; SUBRAMONIAM, T. Cryopreservation of Spermatophores and Seminal Plasma of the Edible Crab *Scylla serrata*. **The Biological Bulletin**, [s.l.], v. 177, n. 2, p.247-253, out. 1989.

LABBE, Catherine; ROBLES, V; HERRAEZ, M. P. Cryopreservation of gametes for aquaculture and alternative cell sources for genome preservation. In: ALLAN, Geoff; BURNELL, Gavin. **Advances in Aquaculture Hatchery Technology**. [s.l.]: Woodhead, 2013. Cap. 3. p. 76-116.

LEITE, Liliane Veras *et al.* Criopreservação de sêmen de tambaqui com ACP adicionado de gema de ovo. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**. [s.l.], v. 6, n. 2, p.23-29, ago. 2011.

LEZCANO, Magda; GRANJA, Clarissa; SALAZAR, Marcela. The use of flow cytometry in the evaluation of cell viability of cryopreserved sperm of the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Cryobiology**, [s.l.], v. 48, n. 3, p.349-356, jun. 2004.

LOPES, Júlia Turgilio. **Lecitina de soja e antioxidantes na composição de meios de congelamento espermática de tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. 2019. 76 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2019.

MISAMORE, Michael J.; BROWDY, Craig L. Mating behavior in the white shrimps *Penaeus setiferus* and *P. Vannamei*: a generalized model for mating in *penaeus*. **Journal of Crustacean Biology**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.61-70, 1 jan.1996.

- MORALES-UENO, Karina *et al.* A simple method for short-term storage and transportation of spermatophores of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Hidrobiológica**, Distrito Federal, v. 26, n. 1, p. 9-14, jul. 2016.
- MOSS, Shaun M. *et al.* The role of selective breeding and biosecurity in the prevention of disease in penaeid shrimp aquaculture. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v. 110, n. 2, p.247-250, jun. 2012.
- NIMRAT, Subuntith *et al.* Chilled storage of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) spermatophores. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 261, n. 3, p.944-951, dez. 2006.
- NIMRAT, Subuntith *et al.* Cryopreservation of banana shrimp (*Fenneropenaeus merguensis*) spermatophores with supplementation of medicinal plant extracts: Development of a programmable controlled-rate method and a practical method. **Aquaculture**, [s.l.], v. 515, p.734537-734537, jan. 2020.
- NIMRAT, Subuntith; SANGNAWAKIJ, Teerapat; VUTHIPHANDCHAI, Verapong. Preservation of Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* Spermatophores by Chilled Storage. **Journal of The World Aquaculture Society**, [s.l.], v. 36, n. 1, p.76-86, 3 abr. 2007.
- NIMRAT, Subuntith; VUTHIPHANDCHAI, Verapong. Role of bacterial in the chilled storage and cryopreservation of sperm in aquatic animals: a review. In: **Aquaculture Research Trends**. Nova Science Publishers, Inc. USA, 2008. p. 149-184.
- PARODI, J. *et al.* Effects of storage time on the motility, mortality and calcium levels of Atlantic salmon *Salmo salar* spermatozoa. **Journal of Fish Biology**, [s.l.], v. 90, n. 4, p. 1506-1516, 9 jan. 2017.
- PEGG, David E. -Principles of Cryopreservation. In: **PreservAtion of HumAn oocytes**. CRC Press, 2009. p. 34-46.
- PERALTA-MARTÍNEZ, María de Los Angeles *et al.* Morphometric relationships among spermatophore structures and their association with female fertility in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Applied Aquaculture**, [s.l.], v. 31, n. 4, p. 301-308, 17 mar. 2019.
- REN, Shengjie *et al.* Quantitative Genetic Assessment of Female Reproductive Traits in a Domesticated Pacific White Shrimp (*Penaeus vannamei*) Line in China. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 1-10, 12 maio 2020.
- SHALIUTINA, Anna *et al.* Effect of short-term storage on quality parameters, DNA integrity, and oxidative stress in Russian (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Siberian (*Acipenser baerii*) sturgeon sperm. **Animal Reproduction Science**, [s.l.], v. 139, n. 1-4, p. 127-135, jun. 2013.
- SILVA, Emanuell Felipe *et al.* Use of fluorescent microscopy for sperm quality of penaeids. **Journal of Crustacean Biology**, [s.l.], v. 35, n. 1, p.26-29, 14 jan. 2015.
- SUI, Juan *et al.* Genetic parameters and response to selection for harvest body weight of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research**, [s.l.], v. 47, n. 9, p.2795-2803, 20 mar. 2015.

SUN, C. *et al.* Optimization of handling and refrigerated storage of guppy *Poecilia reticulata* sperm. **Journal of Fish Biology**, [s.l.], v. 77, n. 1, p. 54-66, 21 jun. 2010.

TRIGO, P.; MERINO, O.; FIGUEROA, E.; VALDEBENITO, I.; SÁNCHEZ, R.; RISOPATRÓN, J. Effect of short-term semen storage in salmon (*Oncorhynchus mykiss*) on sperm functional parameters evaluated by flow cytometry. **Andrologia**, [s.l.], v. 47, n. 4, p. 407-411, 9 abr. 2014.

UBERTI, M. F. *et al.* Assessment of viability of sperm cells of *Litopenaeus vannamei* on cryopreservation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s.l.], v. 57, n. 3, p. 374-380, 18 mar. 2014.

VIVEIROS, A. T. M.; TAFFAREL, T. R.; LEAL, M. C. Osmolality and composition of the extender during the cold storage of *Prochilodus lineatus* (Characiformes: prochilodontidae) sperm. **Neotropical Ichthyology**, [s.l.], v. 12, n. 3, p. 643-648, 23 jun. 2014.

VUTHIPHANDCHAI, V. *et al.* Development of a cryopreservation protocol for long-term storage of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatophores. **Theriogenology**, [s.l.], v. 68, n. 8, p.1192-1199, nov. 2007.

WALE, Petra L.; GARDNER, David K. The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. **Human Reproduction Update**, [s.l.], v. 22, n. 1, p. 2-22, 22 jul. 2015.