

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA**

**ULTRAESTRUTURA DO ESPERMATOZÓIDE
E EFEITO DA ALIMENTAÇÃO NA
QUALIDADE ESPERMÁTICA DO CAMARÃO-
ROSA *Farfantepenaeus paulensis*
(CRUSTACEA: DECAPODA)**

ANDRÉ LUIZ BRAGA DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Oceanografia
Biológica da Universidade Federal do
Rio Grande, como requisito parcial à
obtenção do título de MESTRE.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Wasielesky Júnior

**RIO GRANDE
Julho de 2009**

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMO	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUÇÃO GERAL	5
MATERIAL E MÉTODOS GERAIS	13
CAPÍTULO 1 – MORFOLOGIA DO ESPERMATÓFORO E ULTRAESTRUTURA DO ESPERMATOZÓIDE DO CAMARÃO-ROSA <i>Farfantepenaeus paulensis</i> (Pérez-Farfante 1967)	14
INTRODUÇÃO	14
MATERIAL E MÉTODOS	16
RESULTADOS	18
DISCUSSÃO	25
CONCLUSÕES	36
CAPÍTULO 2 – EFEITO DA ALIMENTAÇÃO NA QUALIDADE ESPERMÁTICA E NA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DOS TECIDOS DE REPRODUTORES DO CAMARÃO-ROSA <i>Farfantepenaeus paulensis</i> (Pérez- Farfante 1967)	37
INTRODUÇÃO	37
MATERIAL E MÉTODOS	40
RESULTADOS	45
DISCUSSÃO	52
CONCLUSÕES	64
CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
LITERATURA CITADA	67
APÊNDICES	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Morfometria dos espermatozóides do camarão-rosa <i>Farfantepenaeus paulensis</i> (médias $\pm$ desvio padrão).....	21
Tabela 2: Morfometria de espermatozóides uniestrelados.	28
Tabela 3: Composição centesimal (%) dos alimentos (peso seco) oferecidos ao camarão-rosa <i>Farfantepenaeus paulensis</i> durante o período experimental.....	46
Tabela 4: Sobrevivência, qualidade espermática e peso do hepatopâncreas dos machos do camarão-rosa <i>Farfantepenaeus paulensis</i> alimentados com alimento fresco, ração e alimento fresco mais ração (médias $\pm$ desvio padrão).	47
Tabela 5: Composição bioquímica da hemolinfa, hepatopâncreas e músculo dos machos do camarão-rosa <i>Farfantepenaeus paulensis</i> alimentados com alimento fresco, ração e alimento fresco mais ração (médias $\pm$ desvio padrão).	50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Espermatóforo do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. ap – apêndice; cp – corpo principal; cr – camadas acelulares de revestimento. Ampliação de 9X. 19
- Figura 2: Massa espermática (me) contida no espermatóforo de *Farfantepenaeus paulensis*, mostrando os espermatozóides (ez) em meio à secreção adesiva (sa). Ampliação de 1150X. 20
- Figura 3: Espermatozóides do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. cp – corpo principal; ep – espinho. 21
- Figura 4: Espermatozóide do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. (A) Constituição ultraestrutural; (B, C, D) pró-núcleo e camada citoplasmática. ca – capuz acrossômico; rs – região subacrossômica; pn – pró-núcleo; ct – citoplasma; cf – cromatina fibrilar; gn – grânulos pró-nucleares; ml – membranas lamelares; vp – vesículas pequenas; vg – vesículas grandes. 22
- Figura 5: Espermatozóide de *Farfantepenaeus paulensis*, mostrando o complexo acrossômico. va – vesícula acrossômica; ep – espinho; rs – região subacrossômica; rp – região periférica do capuz acrossômico; rc – região central do capuz acrossômico. 23
- Figura 6: Espinho do espermatozóide do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*, (A) seção longitudinal e (B) transversal. rs – região subacrossômica; ep – espinho; st – seção transversal do espinho; rp – região periférica do capuz acrossômico; rc – região central do capuz acrossômico. 24
- Figura 7: Índices espermatosomático (I) e hepatossomático (II) dos camarões-rosa *Farfantepenaeus paulensis* alimentados com alimento fresco (A), ração (R) e alimento fresco mais ração (AR). As barras verticais indicam o desvio padrão da média e letras diferentes indicam diferença estatística significativa. 49

RESUMO

Os estudos desenvolvidos na presente dissertação tiveram como objetivo contribuir para o conhecimento de aspectos da biologia reprodutiva do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. O primeiro estudo objetivou caracterizar a ultraestrutura do espermatozóide do camarão-rosa. Para esse estudo de caracterização morfológica, os espermatóforos e espermatozóides foram analisados em microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. O espermatozóide do camarão-rosa foi classificado como uniastrelado, constituído por um corpo principal e um único espinho derivado do acrossoma. O corpo principal do espermatozóide é formado por uma fina camada citoplasmática perinuclear, pelo pró-núcleo constituído de cromatina em estado fibrilar, pelo capuz acrossômico e pela região subacrossômica. O espinho é formado por microfilamentos em toda sua extensão. O comprimento total médio dos espermatozóides é de 10,71µm, com diâmetro médio do corpo de 5,56µm e espinho com 5,15µm de comprimento médio e 0,85µm de diâmetro. Os comprimentos do espermatozóide e do espinho e as membranas lamelares citoplasmáticas pouco visíveis são as características ultraestruturais específicas do espermatozóide desta espécie. O segundo estudo teve como objetivo avaliar o efeito da dieta na qualidade espermática e a composição bioquímica nos tecidos. Nesse experimento foram testados três tratamentos: alimento fresco, ração e alimento fresco mais a ração. A qualidade espermática foi avaliada por meio dos parâmetros: peso do espermatóforo, índice espermatoossomático, número de espermatozóides, taxas de melanização e de ausência de espermatóforo. Os tecidos utilizados para a análise bioquímica de proteína, triglicerídeos e glicose, foram hemolinfa, hepatopâncreas e músculo. Ao final do experimento, a sobrevivência média final dos camarões de cada tratamento foi

calculada. Após os 40 dias de experimento, o peso do espermatóforo e o número de espermatozóides não diferiram entre os tratamentos. No tratamento ração a taxa de melanização (42,85%) foi maior do que nos tratamentos alimento fresco (15,38%) e alimento fresco mais ração (12,51%). Em camarões alimentados apenas com ração foi registrado o maior percentual de ausência de espermatóforo (42,85%). No final do período experimental, todos os animais do tratamento ração apresentaram espermatóforos. Entre os tratamentos, a concentração média de glicose na hemolinfa foi a única que apresentou variação significativa, com maior média associada à ração ($31,19\text{mg.dl}^{-1}$), identificada como estresse fisiológico nos camarões. A sobrevivência média final registrada no tratamento ração foi de 50%, contudo não houve diferença em relação aos demais tratamentos (86,66% para ambos). O estudo indica que para os machos reprodutores de *F. paulensis* o uso de apenas ração é prejudicial para o estado fisiológico e para a qualidade espermática, principalmente em relação às taxas de melanização e ausência de espermatóforo. Além disso, a inclusão de itens frescos é importante por evitar: estresse, baixas sobrevivências e elevadas taxas de melanização e de ausência de espermatóforo.

Palavras-chave: *Farfantepenaeus paulensis*, reprodução, ultraestrutura, espermatozóide, alimentação, qualidade espermática.

ABSTRACT

The objective of the present work was to contribute for reproductive biology knowledge aspects of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. First study intended to recognize the spermatozoal ultrastructure. For this study of the morphologic characterization of the spermatozoon, spermatophore and spermatozoa were analyzed by transmission and scanning electron microscopy. Spermatozoon of pink shrimp is characterized as unistellate by the presence of a main body and a spike derived from acrosoma. Main body is formed by a thin cytoplasmic band, pro-nucleus from usual chromatin pattern fibrilar, acrosomal cap and subacrosomal region. The spike contains microfilaments since basis until tip. Cell mean length is 10.71 μ m, with main body mean diameter is 5.56 μ m and spike mean length is 5.15 μ m and mean diameter is 0.85 μ m. Spermatozoon measurement and small cytoplasmic membrane lamellae are specific ultrastructures of pink shrimp spermatozoon. The second study had the objective to evaluate the effect of different diets in sperm quality and tissues biochemical composition in the male pink shrimp. In that experiment was used three treatment: fresh food, commercial diet and mix of fresh food and commercial diet. Sperm quality was evaluated by: spermatophore weight, spermatosomatic index, sperm count and melanization and spermatophore ausence rates. Tissues used for biochemical analyses of protein, triacylglycerides and glucose were haemolymph, hepatopancreas, and muscle. Shrimp mean survival was registered at the end of the experiment. Spermatophore weight and sperm count were not significantly different between treatments. At the end of the experiment, shrimp fed only with commercial diet show the highest melanization rate (42.85%), followed by treatments fresh food (15.38%) and mix (12.51%). In the treatments commercial diet were observed the highest percentages

of males without spermatophore (42.85%). At the treatment fresh food all shrimps showed spermatophore at the end of the experiment. Glucose concentration in the haemolymph was the only that show significant variation between treatments and was higher in the treatment commercial diet ($31.19\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$), in this was viewed physiologic stress in the shrimps. Survival in the treatment commercial diet was 50%, however show not significant different between treatments. This study showed that diet only with commercial diet is prejudicial for the physiologic state and the sperm quality. The inclusion of the fresh food is important for to avoid: stress, survival low and spermatophore ausence and melanization rate high.

Keywords: *Farfantepenaeus paulensis*, reproduction, ultrastructure, spermatozoa, feed, sperm quality.

INTRODUÇÃO GERAL

Os camarões são organismos bentônicos habitantes de oceanos, estuários e águas dulcícolas. Esses animais são caracterizados por apresentarem um corpo comprimido lateralmente recoberto por uma carapaça sintetizada de quitina que lhe confere uma estrutura rígida. Possuem duas regiões distintas, a anterior denominada de cefalotórax e a posterior referida como abdômen (Dall *et al.* 1990, Ruppert & Barnes 2005).

Os camarões pertencem à ordem Decapoda, a qual inclui crustáceos com cinco pares de apêndices torácicos (pereiópodos) e cinco pares de apêndices abdominais (pleópodos), sendo responsáveis pela locomoção e natação, respectivamente. Na ordem Decapoda estão incluídos também as lagostas, lagostins, caranguejos e siris (Ruppert & Barnes 2005).

A ordem Decapoda foi dividida inicialmente nas subordens Natantia e Reptantia, considerando principalmente aspectos morfológicos externos. Assim, a primeira subordem compreende decápodos em forma de camarões, enquanto a segunda é representada pelos decápodos de demais formas, como caranguejos, siris, lagostas e lagostins. No entanto a classificação em Natantia e Reptantia foi considerada artificial por considerar basicamente a forma externa dos decápodos (Dall *et al.* 1990).

Assim, atualmente a ordem Decapoda é dividida nas subordens Pleocyemata e Dendrobranchiata, considerando entre outros fatores aspectos reprodutivos. As fêmeas da subordem Pleocyemata retêm ou incubam os ovos nas cerdas dos pleópodos. A eclosão ocorre no estágio de zoea. A subordem Pleocyemata compreende as infraordens Astacidea, Thalassinidea, Palinura, Anomura, Stenopodidea, Brachyura e Caridea. Enquanto na subordem Dendrobranchiata, os ovos são demersais, não sendo

transportados nos pleópodos das fêmeas e o náuplio é o primeiro estágio larval (Dall *et al.* 1990). Por sua vez, essa subordem inclui as superfamílias Sergestoidea e Penaeoidea. A Superfamília Penaeoidea abrange cinco famílias, dentre elas, a Penaeidae (Pérez-Farfante & Kensley 1997).

Os camarões pertencentes à família Penaeidae, comumente denominados peneídeos, constituem o grupo mais diverso e abundante em comunidades marinhas tropicais e subtropicais (Dall *et al.* 1990). Esses animais estão ainda entre os recursos pesqueiros mais explorados tanto na pesca como na aquacultura. Barbieri-Júnior & Neto (2001), por exemplo, citam que cerca de 340 espécies de camarões são pescadas comercialmente no mundo todo, das quais 110 são peneídeos. O que evidencia a importância ecológica e comercial dessa família.

O sistema reprodutor de fêmeas de camarões peneídeos é composto por gônadas bilobadas tubulares, que se encontram distribuídas dorso-lateralmente ao intestino. Cada par de ovários apresenta um oviduto localizado dorso-ventralmente na porção cefalotorácica, e que desemboca em gonoporos na altura do terceiro par de pereiópodos, por onde são liberados os ovócitos durante a desova (Bray & Lawrence 1992; Browdy 1992).

Em machos peneídeos, o sistema reprodutor é constituído do testículo e do vaso deferente. O testículo é composto por seis pares de lóbulos e está localizado no meio do cefalotórax, entre o coração e o estômago. O vaso deferente inicia-se na porção posterior do testículo e segue até a base do quinto par de pereiópodos. O vaso deferente é dividido em quatro regiões morfológicas distintas: proximal, média, distal e ampola terminal (Dall *et al.* 1990, Bray & Lawrence 1992).

Nos testículos são produzidas todas as células espermáticas (Medina 1994). Fransozo (2008), por exemplo, encontrou em testículos maduros de *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller 1862) espermatogônias (células arredondadas com pró-núcleo grande e central), espermatócitos I (células arredondadas, menores do que as espermatogônias, difícil distinguir o pró-núcleo do citoplasma), espermatócitos II (células arredondadas, do mesmo tamanho dos espermatócitos, com pró-núcleo central esférico e com a cromatina compactada), espermátides (células pequenas com pró-núcleos basófilos e grandes em relação ao citoplasma) e espermatozóides (células alongadas).

Ao longo da passagem dos espermatozóides pelas diferentes regiões do vaso deferente, as mesmas são compactadas e aglomeradas em uma matriz seminal (Malek & Bawab 1974). Ao atingir a ampola terminal, a matriz seminal é envolta por diferentes camadas formando os espermatóforos (Bauer 1991). Durante a cópula, os espermatóforos são transferidos para a fêmea (Browdy 1992) e têm, portanto, como principal função proteger os espermatozóides durante a transferência para as fêmeas (Subramoniam 1991).

As estruturas reprodutivas externas em peneídeos, que representam os caracteres sexuais secundários, são o téllico e o petasma. Nas fêmeas o principal caractere externo é o téllico e nos machos o petasma. Essas estruturas apresentam variação morfológica entre as espécies de peneídeos (Dall *et al.* 1990).

O téllico está localizado na região postero-ventral do cefalotórax, entre o quarto e o quinto par de pereiópodos. Este órgão está relacionado com a fixação e/ou estocagem de espermatóforos (Bray & Lawrence 1992). Pérez-Farfante (1975), classificou os peneídeos em dois táxons com relação ao téllico. O primeiro abrange animais de téllico aberto, como *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad 1936), *Litopenaeus*

vannamei (Boone 1931), *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus 1767) e *Litopenaeus occidentalis* (Streets 1871), que consiste numa estrutura de placas de esternitos modificadas, formando depressões abertas (Dall *et al.* 1990). No segundo, contudo, o télico é formado por duas placas que se enrijecem após a muda, denominado de télico fechado e pertencem a esse grupo as espécies como *Penaeus monodon* (Fabricius 1798), *Farfantepenaeus subtilis* (Pérez-Farfante 1967), *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille 1817), *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante 1967), *Trachypenaeus byrdi* (Burkenroad 1934), *Xiphopenaeus riveti* (Bouvier 1907) e *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller 1862) (Dall *et al.* 1990). Nas espécies de télico fechado, as placas de esternitos são modificadas formando uma depressão, o receptáculo seminal (Misamore & Browdy 1996). Nas espécies de télico aberto, os receptáculos seminais estão ausentes (Pérez-Farfante & Kensley 1997).

O petasma, por sua vez, é a genitália do macho resultante da modificação dos endopoditos do primeiro par de pleópodos (Pérez-Farfante & Kensley 1997). Os endopoditos são unidos por meio do encaixe de minúsculas estruturas em forma de ganchos, conhecidas como “cincinnuli” (Bauer 1991). Conforme a flexibilidade dos lobos laterais dos endopoditos e o seu grau de aproximação, o petasma pode ser de quatro tipos morfológicos: aberto, no qual os lobos laterais são completamente flexíveis e são parcial ou inteiramente expandidos lateralmente; semiaberto, em que os lobos laterais são flexíveis e dobrados, formando um amplo espaço entre cada endopodito; semifechado, os lobos são pouco flexíveis e marcadamente dobrados, formando um espaço pequeno entre os endopoditos; e fechado, com lobos laterais formando estrutura rígida, delimitando um espaço bastante reduzido entre os endopoditos (Pérez-Farfante & Kensley 1997). A função mais provável do petasma está relacionada com a inseminação

(Bauer 1991), pois essa estrutura está envolvida na transferência dos espermátóforos para o téllico das fêmeas (Pérez-Farfante & Kensley 1997).

Além das estruturas morfológicas reprodutivas secundárias, Dall *et al.* (1990) apontam diferenças relacionadas aos caracteres sexuais secundários em peneídeos. Por exemplo, a cópula, em camarões que apresentam téllico aberto, ocorre com ambos os sexos em período de intermuda e os espermátóforos são aderidos ao téllico. Nos camarões de téllico fechado, a cópula ocorre com machos que estão em intermuda e fêmeas recém mudadas, com a carapaça mole, que permite inserir o espermátóforo no téllico através do receptáculo seminal (Dall *et al.* 1990).

Os processos de maturação e de reprodução dos camarões peneídeos são estimulados, em parte, pelos hormônios secretados pelo complexo órgão X – glândula do seio. Esse complexo constitui um centro neuroendócrino localizado em ambos os pedúnculos oculares e é formado pela glândula do seio e pelo órgão X. A glândula do seio é um órgão neuro-hemal, isto é, um sistema de neurônios especializados na produção, armazenamento e secreção de hormônios. Essa glândula armazena e secreta, de forma controlada ainda os produtos de secreção do órgão X. Esse, por sua vez, constitui corpúsculos celulares neurosecretores, que desembocam na glândula do seio (Fingerman 1997).

O tipo de alimento oferecido aos camarões é um fator importante para a maturação sexual (Browdy 1992). Em machos, uma ferramenta para avaliar a eficácia das dietas para promover a maturação e a reprodução de camarões é a qualidade espermática (Perez-Velazquez *et al.* 2002, Meunpol *et al.* 2005, Coman *et al.* 2007b). Geralmente, a qualidade espermática é avaliada considerando os parâmetros peso do espermátóforo, número de espermatozóides, número de células normais e número de

células anormais (Díaz *et al.* 2001, Perez-Velazquez *et al.* 2001, Ceballos-Vázquez *et al.* 2003, 2004, Coman *et al.* 2007a).

A análise bioquímica dos tecidos é outro método que auxilia na avaliação da qualidade dos alimentos oferecidos (Sánchez *et al.* 2001, Racotta *et al.* 2003). As proteínas e os triglicerídeos estão envolvidos em funções reprodutivas, como a síntese dos gametas (Harrison 1990, Goimier *et al.* 2006), e energéticas, como composição dos tecidos de reserva (Palacios *et al.* 1999). Desta forma, as concentrações desses componentes bioquímicos têm sido utilizadas como indicadores nutricionais e reprodutivos de camarões peneídeos (Mercier *et al.* 2006). A concentração de glicose presente nos tecidos, por sua vez, tem sido usada como parâmetro para indicar estresse em crustáceos (Mercier *et al.* 2006).

A biologia reprodutiva de algumas espécies de peneídeos ainda é pouco conhecida (Rothlisberg 1998). Estudos morfológicos das estruturas reprodutivas, assim como os bioquímicos e fisiológicos, são importantes para o entendimento do ciclo reprodutivo e dos mecanismos envolvidos no processo reprodutivo de crustáceos (Krol *et al.* 1992).

Dentre as espécies de camarões peneídeos encontradas no Brasil está o *F. paulensis*, popularmente denominado camarão-rosa. A distribuição do camarão-rosa dá-se desde as águas costeiras de Ilhéus na Bahia até Mar del Plata na Argentina. O ciclo de vida do *F. paulensis* é caracterizado por reprodução e desova em águas oceânicas em profundidade entre 40 e 100m e crescimento em estuários (D’Incao 1991). Assim, os estuários funcionam como berçários para as pós-larvas de *F. paulensis*. Nesses ambientes, essas pós-larvas encontram abrigo e alimentos em abundância. Nesse

contexto, os camarões crescem exponencialmente, atingindo em poucos meses o tamanho comercial (D’Incao 1991).

No estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul (RS), essa espécie é o principal recurso pesqueiro explorado (Almeida & D’Incao 1999, D’Incao *et al.* 2002). Em face à pequena amplitude de maré, na região estuarina da Lagoa dos Patos, vento e intensidade das chuvas são os principais fatores responsáveis pelas variações de salinidade, características de um ambiente estuarino. Assim, ventos oriundos do quadrante SE são responsáveis pela entrada de água salgada, em contrapartida ventos N-NE e/ou elevadas taxas pluviométricas ocasionam vazantes de água doce (Möller *et al.* 1996, Möller *et al.* 2001, Fernandes *et al.* 2004). Como consequência, a penetração dos camarões no estuário está associada à entrada da água salgada e, por isso, as safras anuais de *F. paulensis* apresentam grandes flutuações devido à variabilidade climática da região. Este quadro, por fim, pode comprometer a lucratividade da atividade camaroneira, impondo dificuldades principalmente aos pescadores artesanais (Wasielesky 2000).

Os estudos sobre *F. paulensis* são estimulados não somente pelo desenvolvimento crescente da carcinocultura mundial e brasileira (FAO 2009), mas também pela importância econômica e ecológica da espécie no estuário da Lagoa dos Patos (D’Incao 1991). Por isso, ao longo de mais de duas décadas vêm sendo desenvolvidas linhas de pesquisa com esta espécie, sendo separadas em maturação, larvicultura e engorda. Dentro de cada uma dessas linhas destacam-se os diversos estudos envolvidos na criação do camarão-rosa, como por exemplo, técnicas de cultivo (Marchiori & Boff 1983), qualidade de água (Boff & Marchiori 1984, Vinatea & Andreatta 1997, Henning & Andreatta 1998, Tsuzuki *et al.* 2003, Wasielesky *et al.*

2003), alimentação e nutrição (Pontes & Andreatta 2003, Soares *et al.* 2004, 2005a, 2005b, Martins *et al.* 2006, Soares *et al.* 2006, Fróes *et al.* 2007, Abe *et al.* 2008, Soares *et al.* 2008), imunidade fisiológica (Perazzolo & Barracco 1997, Perazzolo *et al.* 2002, 2005), sistemas alternativos de criação (Krummenauer *et al.* 2006, Malpartida & Vinatea 2007) e mais recentemente cultivo em meio heterotrófico (Thompson *et al.* 2002, Ballester *et al.* 2003, Abreu *et al.* 2007, Ballester *et al.* 2007).

A maior parte dos estudos referentes ao processo reprodutivo do camarão-rosa é relacionada às fêmeas (Cavalli *et al.* 1997, Cavalli *et al.* 1998, Peixoto *et al.* 2003, Peixoto *et al.* 2004a, 2004b, Nakayama *et al.* 2008a), e os estudos sobre a biologia reprodutiva de machos do camarão-rosa *F. paulensis* são escassos (Costa 1992, Cavalli *et al.* 1997, Peixoto *et al.* 2004b, Nakayama *et al.* 2008b).

Desta forma, a presente dissertação reúne algumas informações sobre a biologia reprodutiva de machos e é dividida em dois capítulos, no primeiro foi realizada a caracterização ultraestrutural do espermatozóide do camarão-rosa, e no segundo foi avaliado o efeito da alimentação na qualidade espermática de *F. paulensis* em cativeiro.

MATERIAL E MÉTODOS GERAIS

Captura de reprodutores e aclimação

Os reprodutores (n=300) de *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante 1967) foram coletados na costa de Santa Catarina (26°54'S e 48°34'W) e conduzidos em caixas de transporte, por via rodoviária, para a Estação Marinha de Aqüicultura (EMA) do Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), RS.

Durante sete dias os animais foram aclimatados em tanques circulares de maturação de fundo de concreto (10m² de área de fundo) preenchidos com 5000l de água do mar filtrada (0,5m de profundidade) a uma densidade de 75 camarões por m². A água dos tanques foi renovada diariamente em 90% e sua temperatura foi mantida em 27°C (±1,6). O fotoperíodo foi de 14 horas de luz por dia.

Neste período a alimentação foi composta de lula *Illex argentinus* (Castellanos 1960), siri *Callinectes sapidus* (Rathbun 1896), peixe *Macrodon ancylodon* (Bloch & Schneider 1801) e ração especial para maturação (Breed S Inve Aquaculture, Bélgica). Os alimentos foram fornecidos de forma alternada quatro vezes ao dia (8:00, 12:00, 14:00 e 18:00 horas).

CAPÍTULO 1 – MORFOLOGIA DO ESPERMATÓFORO E ULTRAESTRUTURA DO ESPERMATOZÓIDE DO CAMARÃO-ROSA *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante 1967)

INTRODUÇÃO

Os espermatozóides de crustáceos decápodos são compactados e agrupados por uma secreção adesiva, formando uma matriz seminal (Hinsch 1991). Essa matriz é envolvida por material acelular, formando o espermatóforo, que no momento da cópula, é transferido para a fêmea (Bauer 1991).

Em crustáceos decápodos, os espermatozóides são estruturalmente diferentes dos demais grupos zoogênicos. Esses espermatozóides são caracterizados pela ausência de flagelo. O espermatozóide, portanto, não possui motilidade, mesmo em contato com a água. A ausência de motilidade é a principal característica dos espermatozóides dos crustáceos decápodos (Shigekawa & Clark 1986).

Os espermatozóides de decápodos são classificados como multi e uniestrelados (Medina 1994). O espermatozóide multiestrelado é típico de não carídeos da subordem Pleocyemata, tais como caranguejos, lagostins e lagostas, isto é, corresponde ao grupo Reptantia. Essas células espermáticas são constituídas por vários apêndices, limitados por uma membrana nuclear que se sobrepõe a membrana plasmática. Esses apêndices são contínuos ao pró-núcleo, contendo cromatina e microtúbulos (Guinot *et al.* 1994, Cuartas & Sousa 2007). O espermatozóide uniestrelado, por sua vez, é típico das subordens Dendrobranchiata e Pleocyemata da infraordem Caridea, agrupando, portanto os decápodos em forma de camarões, que constituem o grupo Natantia. Esse espermatozóide é constituído por um único apêndice alongado, denominado de espinho.

O espinho é uma extensão da estrutura acrossômica, não sendo contínuo ao pró-núcleo (Lynn & Clark 1983, Clark & Griffin 1988).

Alguns estudos têm sido realizados descrevendo a ultraestrutura dos espermatozóides uniastrelados de camarões (Lynn & Clark 1983, Medina *et al.* 1994b, Kim *et al.* 2003, Medina *et al.* 2006). Dentre esses, os peneídeos têm sido mais estudados (Medina 1994, Medina *et al.* 1994b, Scelzo & Medina 2003, Fransozo 2008). No entanto, nenhuma informação está disponível na literatura para o camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*.

A variedade morfológica dos espermatozóides de diferentes espécies pode ser utilizada em estudos taxonômicos e filogenéticos (Felgenhauer & Abele 1991). A ordem Decapoda é um táxon extenso e diverso, na qual as relações internas são ainda controversas e sujeitas à investigação e revisão (Scelzo & Medina 2004). Portanto, o conhecimento da morfologia e dos componentes dos espermatozóides pode ser útil na soma de informações para a estimação da filogenia em decápodos (Medina 1994, Kim *et al.* 2003, Scelzo & Medina 2004).

O estudo da morfologia do espermatozóide, além de auxiliar na classificação taxonômica, ajuda a melhor compreender o funcionamento, processos e estruturas envolvidos na fecundação (Bauer 1991). Essas informações podem contribuir ainda, no futuro, para melhorar a produção em cativeiro (Costa 1992). Desta forma, o presente estudo tem como objetivo caracterizar ultraestruturalmente o espermatozóide do camarão-rosa *F. paulensis*, identificando tanto estruturas gerais típicas de peneídeos como as específicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e fixação de material biológico

Após o período de aclimação, camarões machos (n=45) com peso médio ($\pm$ desvio padrão) de 25,08g ($\pm$ 3,08) foram coletados aleatoriamente dos tanques de maturação da Estação Marinha de Aquacultura (EMA). Os espermatóforos de ambos os lados de cada animal foram extrusados manualmente pela compressão da região lateroventral, posterior à inserção do quinto par de pereiópodos (Petersen *et al.* 1996).

Os espermatóforos esquerdos foram seccionados transversalmente ao meio, com o auxílio de um bisturi, e fixados em 2ml de solução composta por 1:1:1 de glutaraldeído 6%, paraformaldeído 6% e cacodilato de sódio 0,1M. Os espermatóforos direitos foram fixados inteiros e em frascos separados contendo a mesma solução fixadora. Depois de fixados, todos os espermatóforos foram mantidos a 4°C por 24 horas, seguindo a adaptação das metodologias descritas por Hayat (1978), Robinson *et al.* (1987) e Silveira (1989) e o protocolo para preparação do fixador disponível no Apêndice 1.

As amostras foram encaminhadas para o laboratório de Imunologia e Microscopia Eletrônica do Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CPACT-EMBRAPA, Pelotas, RS) para análise dos espermatozóides de camarão-rosa *F. paulensis* sob microscopia eletrônica.

Preparo das amostras

No laboratório, os espermatóforos foram retirados da solução fixadora primária e lavados em 1ml de solução tampão de cacodilato de sódio 0,1M e sacarose 0,2M durante 15 minutos por três vezes. Os espermatóforos foram então pós-fixados em

solução de tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% (1:1 solução de tetróxido de ósmio a 2% e cacodilato de sódio 0,4M) durante três horas a 4°C e posteriormente lavados em água bidestilada durante 15 minutos por duas vezes.

Para desidratação, os espermatóforos foram mantidos em soluções crescentes de etanol (30, 50, 70, 90, 95%) durante cinco minutos por duas vezes em cada solução, até permanecer em etanol absoluto (100%) durante 10 minutos.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a observação em MEV, os espermatóforos permaneceram em solução de etanol 100% e foram colocados na câmara do aparelho de ponto crítico (Emitech K 850) com substituição do etanol por dióxido de carbono (CO_2) líquido. Em seguida, o aparelho foi aquecido provocando a evaporação do CO_2 e secagem das amostras sem modificar sua morfologia.

Os espermatóforos foram montados em suportes porta-amostra de cobre (“stubs”) e banhados em prata líquida para permitir a condução dos elétrons. Após a secagem da prata em estufa a 26°C, as amostras foram levadas ao metalizador (Emitech K 550) para cobertura com camada condutora superficial em ouro. Por fim, os “stubs” com os espermatóforos foram observados em microscópio eletrônico de varredura (Zeiss DSM 940 A).

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a observação em MET, após a desidratação em etanol, os espermatóforos foram imersos em acetona durante 10 minutos por três vezes e corados em azul de metileno 1% e bórax 1% ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$). Subsequentemente, as amostras

permaneceram em solução 1:1 de resina epóxi (Epon 812[®]) e acetona, durante uma hora, à temperatura ambiente sob agitação. Os espermatóforos, em seguida, foram impregnados em resina durante mais uma hora sob agitação e, finalmente, foram emblocados. Os blocos permaneceram em estufa durante cinco dias a 60°C, permitindo a polimerização da resina.

Os cortes semifinos (1000nm) foram realizados em ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT). Os cortes das regiões dos espermatóforos foram selecionados com auxílio de um microscópio estereoscópico (Olimpus BX 51) e foram montados em porta-amostra de cobre, constituído de um disco com cerca de 3mm de diâmetro com grades entrelaçadas. Por fim, os cortes foram observados em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 900).

Análise dos dados

As medidas morfométricas dos espermatozóides (média $\pm$ desvio padrão) foram consideradas em micrometros (μm) e obtidas a partir da MEV. A morfologia externa dos espermatóforos e dos espermatozóides foi analisada por meio da MEV e a ultraestrutura dos espermatozóides por meio da MET.

RESULTADOS

O espermatóforo do camarão-rosa *F. paulensis* é distinguido em duas partes. Uma composta por um corpo principal de forma alongada e a outra por um apêndice, ambas cercadas por algumas camadas de material acelular (Fig. 1).

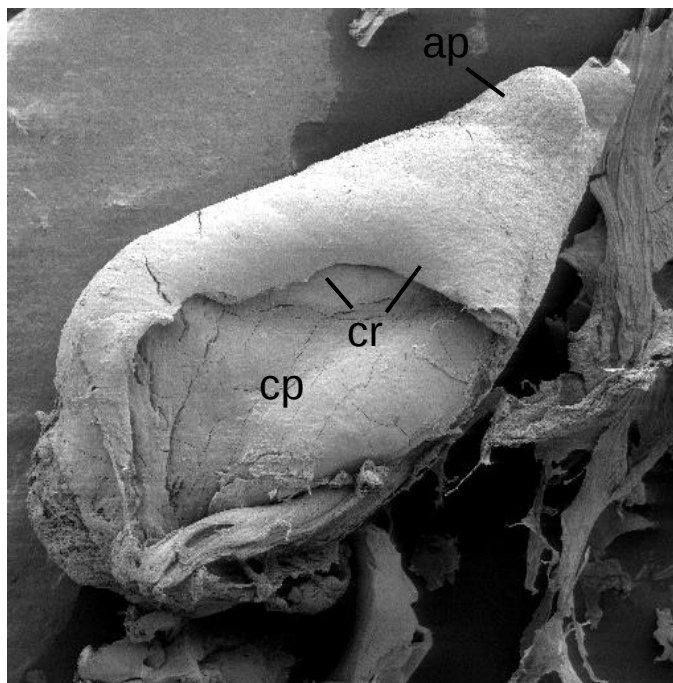


Figura 1: Espermatóforo do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. ap – apêndice; cp – corpo principal; cr – camadas acelulares de revestimento. Ampliação de 9X.

Internamente, o corpo principal dos espermatóforos é constituído por uma densa massa espermática, como mostra a figura 2. Os espermatozóides estão agrupados em uma matriz seminal por uma secreção acelular homogênea de característica adesiva (Fig. 2).

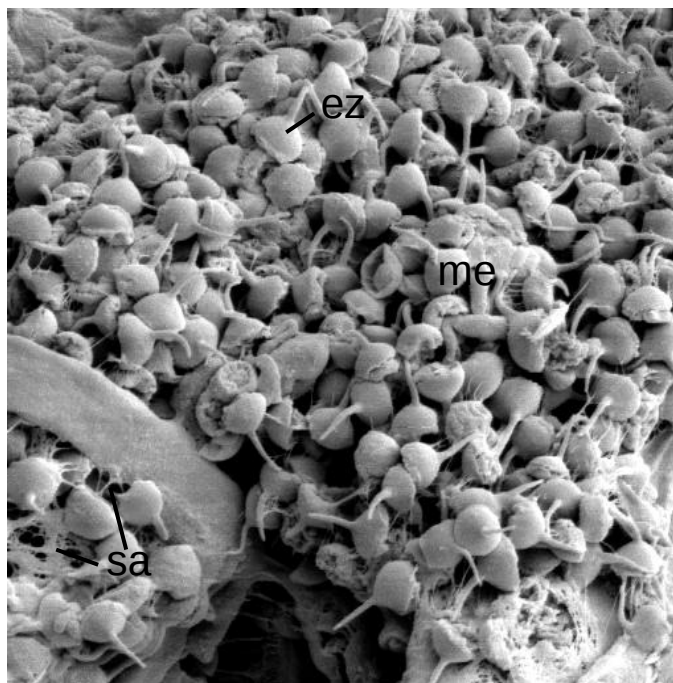


Figura 2: Massa espermática (me) contida no espermatóforo de *Farfantepenaeus paulensis*, mostrando os espermatozóides (ez) em meio à secreção adesiva (sa). Ampliação de 1150X.

Ultraestruturalmente, os espermatozóides do camarão-rosa são constituídos por duas regiões morfológicas diferentes, o corpo principal e o espinho. O corpo apresenta forma esferoidal e o espinho é alongado (Fig. 3).

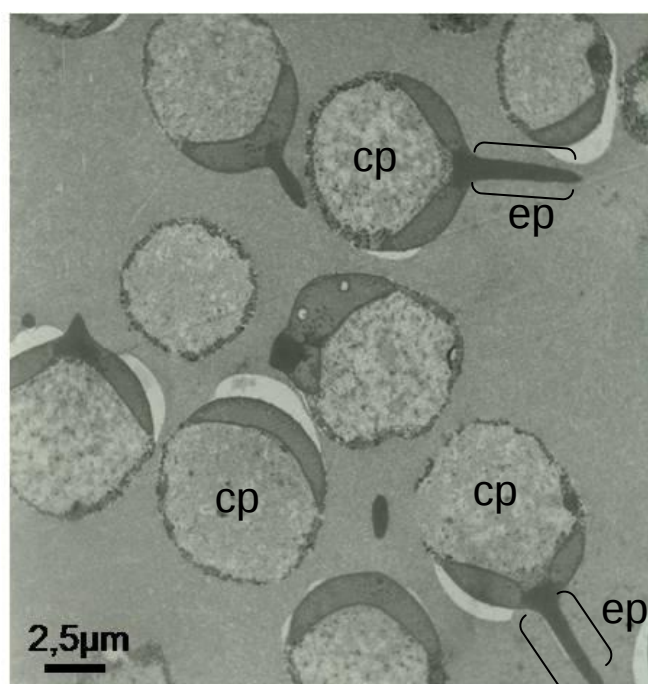


Figura 3: Espermatozoides do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. cp – corpo principal; ep – espinho.

O espermatozoide de *F. paulensis* apresenta comprimento médio de $10,71 \pm 0,79 \mu\text{m}$. Quanto ao corpo principal do espermatozoide, o diâmetro médio total é de $5,56 \pm 0,44 \mu\text{m}$. O comprimento médio total do espinho é de $5,15 \pm 0,52 \mu\text{m}$ e o diâmetro médio total é de $0,85 \pm 0,24 \mu\text{m}$ (Tab. 1).

Tabela 1: Morfometria dos espermatozoides do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (médias $\pm$ desvio padrão).

	Comprimento (μm)	n	Diâmetro (μm)	n
Espermatozoide	$10,71 \pm 0,79$	19	-	-
Corpo	-	-	$5,56 \pm 0,44$	36
Espinho	$5,15 \pm 0,52$	19	$0,85 \pm 0,24$	10

O corpo principal é a porção posterior do espermatozóide de *F. paulensis*. Esse é constituído por citoplasma, pró-núcleo e a porção basal do complexo acrossômico (Fig. 4).

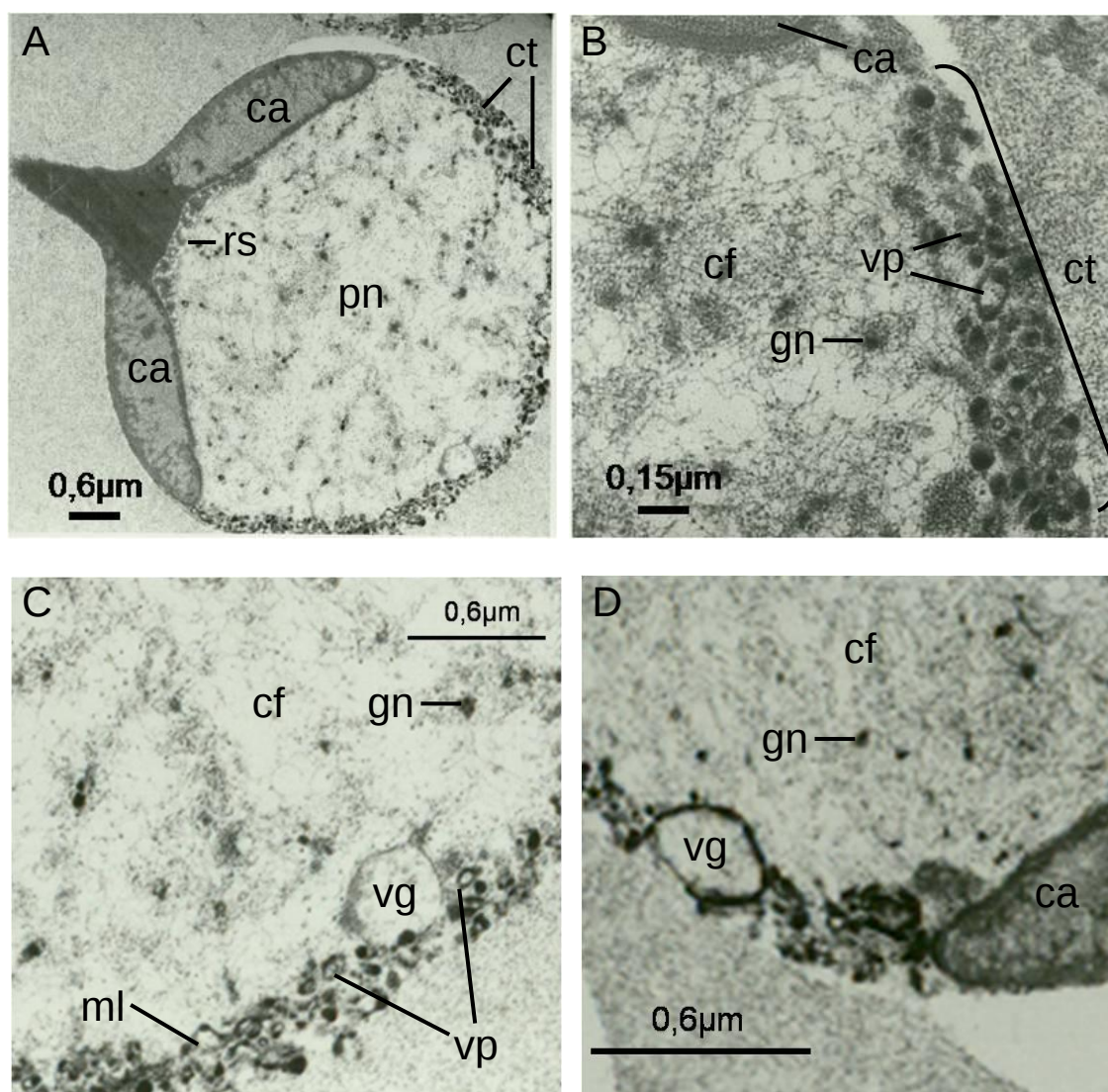


Figura 4: Espermatozóide do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. (A) Constituição ultraestrutural; (B, C, D) pró-núcleo e camada citoplasmática. ca – capuz acrossômico; rs – região subacrossômica; pn – pró-núcleo; ct – citoplasma; cf – cromatina fibrilar; gn – grânulos pró-nucleares; ml – membranas lamelares; vp – vesículas pequenas; vg – vesículas grandes.

O citoplasma consiste de uma estreita camada na borda celular que circunda posteriormente a região pró-nuclear (Fig. 4A). A camada citoplasmática em *F. paulensis* é constituída de membranas lamelares e de duas populações de vesículas, pequenas e grandes (Fig. 4B, C, D). O pró-núcleo é centralizado e ocupa a maior parte do espermatozóide. A região pró-nuclear é constituída por cromatinas não condensadas que formam uma rede de filamentos e grânulos e caracterizada ainda pela ausência da carioteca (Fig. 4). A porção basal do complexo acrossômico é constituída pelo capuz acrossômico e pela região subacrossômica. (Fig. 4A).

O complexo acrossômico é formado pela vesícula acrossômica e pela região subacrossômica. A vesícula acrossômica é constituída pelo capuz acrossômico e pelo espinho do espermatozóide (Fig. 5).

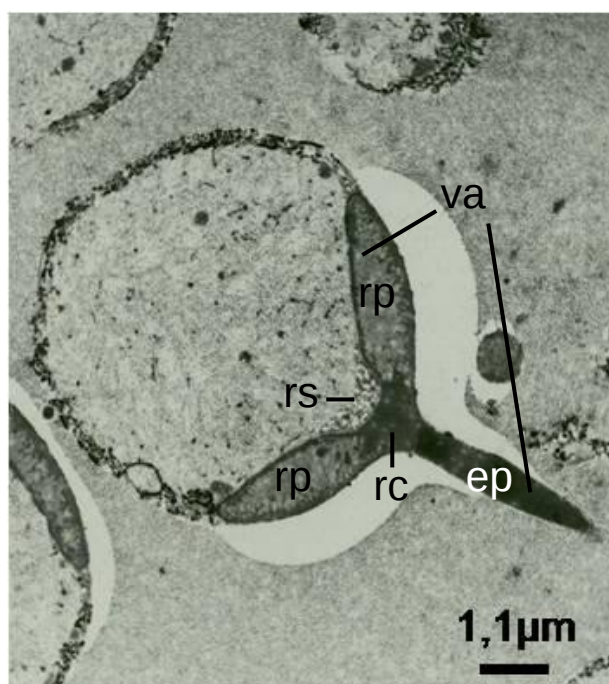


Figura 5: Espermatozóide de *Farfantepenaeus paulensis*, mostrando o complexo acrossômico. va – vesícula acrossômica; ep – espinho; rs – região subacrossômica; rp – região periférica do capuz acrossômico; rc – região central do capuz acrossômico.

O capuz acrossômico é constituído de duas regiões. Nas extremidades possuem grânulos densos em meio a um material menos denso que atribuem característica heterogênea a essa região. O centro do capuz acrossômico coincide com a base do espinho e é constituído de material homogêneo mais denso (Fig. 5, 6A).

O espinho do espermatozóide é projetado anteriormente pelo acrossoma (Fig. 6A). A partir das seções longitudinal (Fig. 6A) e transversal (Fig. 6B) dos espinhos é possível verificar sua constituição de microfilamentos longitudinais.

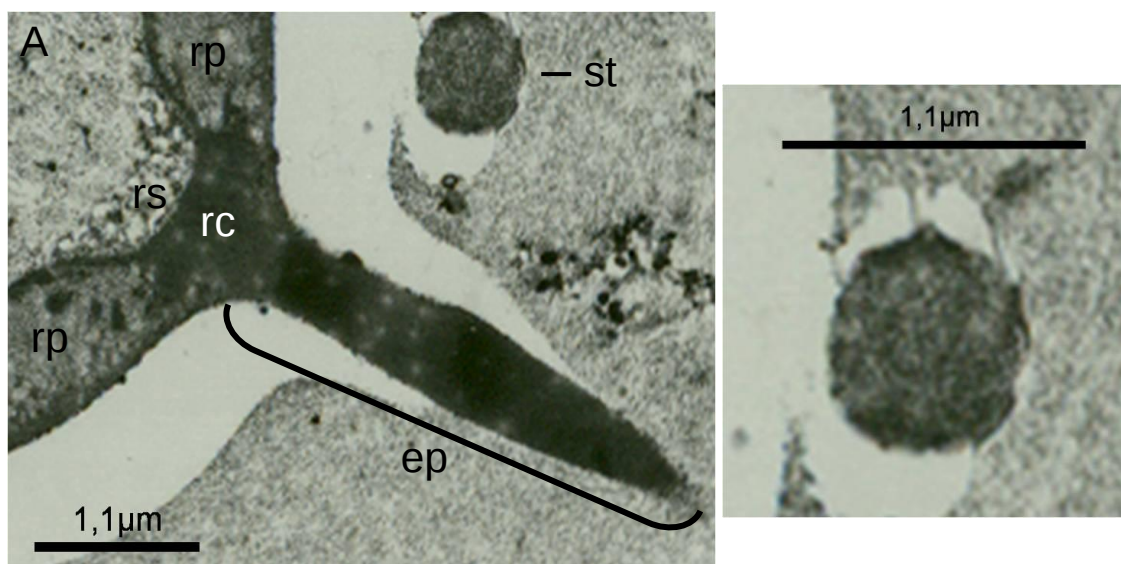


Figura 6: Espinho do espermatozóide do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*, (A) seção longitudinal e (B) transversal. rs – região subacrossômica; ep – espinho; st – seção transversal do espinho; rp – região periférica do capuz acrossômico; rc – região central do capuz acrossômico.

A região subacrossômica é limitada anteriormente pela vesícula acrossômica e posteriormente pelo pró-núcleo. Essa região é constituída ultraestruturalmente por material floculado denso (Fig. 5A e 6A).

DISCUSSÃO

Os espermatóforos são formados a partir da compactação dos espermatozóides em uma matriz seminal, que é formada durante a passagem desses pelas regiões morfológicas do vaso deferente. A síntese final do espermatóforo ocorre, então, na ampola terminal, local onde permanece até a cópula e transferência para o tólico da fêmea (Dall *et al.* 1990).

Malek & Bawab (1974) descreveram três estágios sucessivos durante a formação do espermatóforo de *Penaeus kerathurus* (Forsskål 1775). Primeiro, os espermatozóides são convertidos em uma massa compacta. Esse estágio começa no vaso deferente proximal e é finalizado somente quando os espermatozóides atingem a ampola terminal, onde a massa espermática resultante é retida até a próxima etapa. Durante o segundo estágio, as camadas que constituem os espermatóforos começam a ser depositadas pelas glândulas secretoras. No terceiro estágio, mais camadas são adicionadas e o espermatóforo é modulado na forma final, enrijecendo.

A partir da MEV do espermatóforo de *F. paulensis* foi possível identificar diferentes camadas constituindo o espermatóforo. Como indica a descrição de Malek & Bawab (1974) essas camadas são formadas por secreções das glândulas presentes ao longo do vaso deferente do camarão e têm função de proteger os espermatozóides contidos nos espermatóforos.

A natureza da secreção produzida pelas glândulas do vaso deferente e que constituem as camadas do espermatóforo é ainda desconhecida (Malek & Bawab 1974, Subramoniam 1991). Em Anomura e Brachyura, as secreções não foram reconhecidas como uma proteína e nem foram encontradas evidências de quitina. A presença de proteína foi também registrada em *Carcinus maenas* (Linnaeus 1758), sendo sugerido,

contudo, que a secreção apresenta constituição quitino-proteica, como é observado no exoesqueleto dos artrópodes. Em *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus 1767) foi identificada uma camada quitinosa nos espermatóforos (Malek & Bawab 1974). Entretanto, nenhuma destas conclusões foi adequadamente comprovada (Malek & Bawab 1974), de modo que a natureza dos componentes químicos que formam os espermatóforos dos decápodos permanece desconhecida (Subramoniam 1991).

No presente estudo, foi observada uma secreção de característica adesiva no interior do espermatóforo de *F. paulensis*. Bauer & Cash (1991) também observaram essa secreção no espermatóforo de *Farfantepenaeus aztecus* (Ives 1891) e *Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad 1939). Segundos os autores a secreção adesiva atua concentrando os espermatozóides em uma massa compacta, constituindo a massa espermática que é então “encapsulada” no espermatóforo.

Os peneídeos produzem espermatóforos de complexidades variadas conforme o tipo de télico da espécie (Bauer & Min 1993). As fêmeas de télico aberto geralmente recebem espermatóforos com estruturas acessórias, como “asas”, enquanto em espécies de télico fechado os machos produzem espermatóforos simples (Bauer 1991). Os espermatóforos de *F. paulensis*, observados por MEV no presente estudo, apresentam estrutura semelhante ao padrão encontrado em espécies de peneídeos de télico fechado. São estruturas simples, constituídas por um corpo principal e um apêndice.

Semelhante ao observado no presente estudo no espermatóforo de *F. paulensis*, a diferenciação morfológica do espermatóforo em corpo principal e apêndice também foi observada em *F. aztecus* e *F. duorarum*. Nessas espécies, o corpo principal é constituído pela massa espermática cercada por camadas de material acelular que protegem os espermatozóides. O apêndice é formado apenas pelo material acelular

secretado no canal do vaso deferente (Bauer & Cash 1991). A função do apêndice é desconhecida, mas algumas hipóteses são sugeridas. Segundos essas o apêndice atuaria: (1) como barreira impermeável para proteger os espermatozóides durante a estocagem no télico da fêmea; (2) selante do télico, impedindo a substituição do espermatóforo ou inseminação por outro macho; e/ou (3) envolvido com o posicionamento ou alojamento do espermatóforo dentro do télico (Bauer 1991).

Quanto à ultraestrutura do espermatozóide, a partir da análise das micrografias eletrônicas do presente estudo foi possível observar que o espermatozóide de *F. paulensis* apresenta uma camada citoplasmática perinuclear e cromatina filamentosa localizada no centro do corpo principal, além de um espinho contínuo ao acrossoma, sendo classificado, portanto, como uniestrelado. Embora espermatozóides uniestrelados apresentem padrões morfológicos semelhantes, há uma diversidade de ultraestruturas dessas células espermáticas de espécie para espécie (Felgenhauer & Abele 1991). E uma dessas diferenças está relacionada à morfometria dos espermatozóides, como é possível observar na tabela 2.

Tabela 2: Morfometria de espermatozóides uniestrelados.

Espécies	EZ	CP	EP	Fonte
Pleocyemata				
Caridea				
Palaemonidae				
<i>Macrobrachium rosenbergii</i> (De Man 1879)	12-15	10	4	Lynn & Clark 1983
Pandalidae				
<i>Pandalopsis japonica</i> (Balss 1914)	52-55	24-26	40-44	Kim <i>et al.</i> 2003
Dendrobranchiata				
Penaeoidea				
Sicyoniidae				
<i>Sicyonia carinata</i> (Brünnich 1768)	6,54	3,4	3,01	Clark & Griffin 1988, Medina <i>et al.</i> 1994b
Penaeidae				
<i>Artemesia longinaris</i> (Bate 1888)	6	3,4	2,5	Scelzo & Medina 2003
<i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone 1931)	-	3-4	-	Alfaro <i>et al.</i> 2007
<i>Litopenaeus stylirostris</i> (Stimpson 1874)	-	6,5	-	Alfaro <i>et al.</i> 2007
<i>Litopenaeus occidentalis</i> (Streets 1871)	-	4	3	Alfaro <i>et al.</i> 2003, 2007
<i>Parapenaeus longirostris</i> (Lucas 1846)	5,5	4,2	3	Medina 1994
<i>Penaeopsis serrata</i> (Bate 1881)	6,37	3,49	3,36	Medina <i>et al.</i> 1994b
<i>Trachypenaeus byrdi</i> (Burkenroad 1934)	-	6	3,5	Alfaro <i>et al.</i> 2003
<i>Xiphopenaeus riveti</i> (Bouvier 1907)	-	11-12	4	Alfaro <i>et al.</i> 2003
<i>Penaeus kerathurus</i> (Forsskål 1775)	5	2,9	2,5	Medina <i>et al.</i> 1994a
<i>Marsupenaeus japonicus</i> (Bate 1888)	7,9	4,7	4	Medina <i>et al.</i> 1994a

EZ: comprimento do espermatozóide; CP: diâmetro do corpo principal; EP: comprimento do espinho.

As espécies de carídeos citadas na tabela 2 apresentam espermatozóides maiores que as espécies de Dendrobranchiata. *Trachypenaeus byrdi* e *X. riveti* apresentam espermatozóides com os maiores comprimentos dentre as espécies de Dendrobranchiata (cerca de 9,5 e 15-16, respectivamente). Entre essas espécies, o diâmetro do corpo principal varia amplamente (2,9 a 12) e os comprimentos dos espinhos variam de 2,5 a 4µm. Em *T. byrdi* e *X. riveti* o diâmetro do corpo é duas a três vezes maior do que o comprimento do espinho. Nas demais espécies os valores de diâmetro do corpo e de comprimento do espinho são próximos. Desta forma, o espermatozóide do camarão-rosa está entre os maiores (10,71µm), e o diâmetro do corpo e o comprimento do espinho apresentam valores próximos (5,56µm e 5,15µm,

respectivamente), sendo o espinho maior do que a maioria das espécies de Dendrobranchiata estudadas.

O corpo principal dos espermatozóides uniestrelados é, em geral, constituído por uma região pró-nuclear central cercada posteriormente por uma camada citoplasmática (Felgenhauer & Abele 1991). O espermatozóide de *F. paulensis* apresenta o mesmo padrão, sendo um espermatozóide tipicamente uniestrelado.

A camada citoplasmática dos espermatozóides de Dendrobranchiata é constituída por um complexo de membranas. Esse complexo, por sua vez, é composto por empilhamentos de várias camadas lamelares e por dois tipos de vesículas (pequenas e grandes) (Medina 1994, Medina 1994a, 1994b, Scelzo & Medina 2003, Medina *et al.* 2006).

Kang *et al.* (2008) propuseram que o complexo de membranas da camada citoplasmática dos espermatozóides de *Fenneropenaeus chinensis* (Osbeck 1765) é derivado a partir da degeneração das organelas citoplasmáticas das espermátides, como retículo endoplasmático, mitocôndria, além de restos da carioteca e de material nuclear. Esses mesmos autores descrevem que as mitocôndrias, por exemplo, são observadas no início da espermiogênese, degenerando e, formando, subsequentemente, as vesículas mitocondriais.

Da mesma forma, outros estudos sugerem que as organelas estão presentes nas espermátides e durante a espermiogênese degeneram, permanecendo comumente no espermatozóide maduro de decápodos como vesículas derivadas de organelas degeneradas (Medina 1994, Medina *et al.* 1994a, 1994b, Scelzo & Medina 2003). Em *Sicyonia ingentis* (Burkenroad 1938) as mitocôndrias também são observadas nas espermátides, não sendo encontradas em espermatozóides maduros. Neste caso, as

mitocôndrias também são perdidas durante a degradação citoplasmática na espermiogênese e ocorrem no espermatozóide maduro apenas as vesículas derivadas das mesmas (Shigekawa & Clark 1986).

Para *P. longirostris*, nas espermátides iniciais são encontradas várias organelas citoplasmáticas, como centríolos, complexo de Golgi, ribossomos e mitocôndrias. Após a redução de volume no final da espermiogênese, o citoplasma é formado apenas por restos dessas organelas (principalmente mitocôndrias) e acúmulos de membranas (Medina 1994).

As vesículas grandes estão localizadas mais internamente no citoplasma, estando mais próximas ao pró-núcleo. Essas vesículas são derivadas principalmente de mitocôndrias degeneradas (Medina *et al.* 1994a, 1994b, Scelzo & Medina 2003). As vesículas pequenas estão localizadas na periferia da célula sob a membrana plasmática. Geralmente essas vesículas periféricas derivam das demais organelas presentes nas espermátides (Medina *et al.* 1994a, 1994b).

A camada citoplasmática perinuclear dos espermatozóides do camarão-rosa *F. paulensis* apresentam padrão morfológico típico de espermatozóides uniestrelado. O citoplasma dos espermatozóides da espécie é constituído de vesículas grandes e pequenas e de membranas lamelares. As camadas lamelares do citoplasma de *F. paulensis* são menos abundantes e, conseqüentemente, de difícil observação em relação às demais espécies de Dendrobranchiata, como *P. kerathurus* e *M. japonicus* estudadas por Medina *et al.* 1994b.

A região pró-nuclear de espermatozóides uniestrelados ocupa quase todo o corpo principal. O pró-núcleo é constituído por cromatina em estado descondensado, assumindo forma fibrilar, que juntamente a densos grânulos formam uma rede nuclear

não limitada pelo envelope nuclear, carioteca (Felgenhauer & Abele 1991). O mesmo padrão foi verificado para *F. paulensis*.

Medina (1994) estudou a espermiogênese de *P. longirostris*, sugerindo a seguinte sequência de alterações morfológicas do pró-núcleo no camarão: 1) nas espermátides iniciais, o pró-núcleo é individualizado, ou seja, inteiramente separado do citoplasma pela carioteca, e é formado por extensas áreas de cromatina condensada; 2) nas espermátides intermediárias, a cromatina começa a descondensar, passando a assumir aparência granular, e a carioteca é rompida; 3) nas espermátides finais a cromatina torna-se altamente descondensada; 4) e nos espermatozóides, a cromatina apresenta, então, o usual padrão fibrilar e a carioteca não é mais observada.

Estas características do pró-núcleo dos espermatozóides uniestrelados são importantes durante a reação acrossômica (Pongtippatee *et al.* 2007). A reação acrossômica consiste de mudanças morfológicas do espermatozóide necessárias para a penetração do mesmo no ovócito (Gwo 2000). Em Dendrobranchiata, a reação acrossômica é iniciada com a despolimerização do espinho a partir da ruptura da vesícula acrossômica sobre a superfície do ovócito. Em seguida, a região subacrossômica se torna maior e mais densa, forçando a exocitose do pró-núcleo (Alfaro *et al.* 2003, 2007, Pongtippatee *et al.* 2007, Kruevaisayawan *et al.* 2008). A cromatina fibrilar apresenta relativa elasticidade em relação à cromatina condensada. Assim, o transporte do material genético flexível do gameta masculino para o ovócito, juntamente com a ausência da carioteca, facilita a exocitose (Shigekawa & Clark 1986).

Os espermatozóides sem carioteca e com cromatina fibrilar são típicos de carídeos (Lynn & Clark 1983, Kim *et al.* 2003) e camarões da subordem Dendrobranchiata, como por exemplo, os pertencentes a Sicyoniidae (Shigekawa &

Clark 1986, Clark & Griffin 1988, Medina *et al.* 1994b), Aristeidae (Desantis *et al.* 2006, Medina *et al.* 2006) e Penaeidae (Medina 1994, Medina *et al.* 1994a, 1994b, Scelzo & Medina 2003, Pongtippatee *et al.* 2007). O pró-núcleo dos espermatozóides do camarão-rosa *F. paulensis* apresenta o mesmo padrão encontrado em camarões com espermatozóides uniastrelados.

Anteriormente ao pró-núcleo, está localizada a região acrossômica. A morfologia dessa região é bastante variada entre os Dendrobranchiata. Em Sicyoniidae, a região acrossômica compreende uma vesícula acrossômica e uma região subacrossômica. A vesícula acrossômica contém membranas formando bolsas, grânulo anterior, espinho e uma banda citoplasmática. A região subacrossômica inclui reticulado cristalino, disco em forma de pires, região granular e pétalas. O subacrossoma é separado da vesícula acrossômica pela membrana acrossômica, que juntamente com a membrana plasmática forma a membrana pentalaminar (Clark & Griffin 1988).

Em peneídeos, a região acrossômica é denominada de complexo acrossômico. Semelhante a sicionídeos, o complexo acrossômico de peneídeos consiste de uma vesícula acrossômica e de uma região subacrossômica, contudo ambas são morfologicamente mais simplificadas (Medina 1994, Medina *et al.* 1994a, 1994b, Scelzo & Medina 2003, Alfaro *et al.* 2007, Pongtippatee *et al.* 2007).

A vesícula acrossômica é constituída por material heterogêneo, que a distingue apenas em duas regiões morfológicas o capuz acrossômico e o espinho (Medina 1994, Medina *et al.* 1994a, 1994b, Scelzo & Medina 2003, Alfaro *et al.* 2007, Pongtippatee *et al.* 2007). O capuz acrossômico do espermatozóide de *F. paulensis* é internamente côncavo, incluindo duas regiões morfológicas. A periferia do capuz apresenta material heterogêneo formado por grânulos eletronicamente mais densos em meio a uma matriz

eletronicamente mais translúcida. E o centro do capuz, que coincide com a base do espinho, contém material homogêneo mais denso composto por microfilamentos. Esse padrão morfológico do capuz acrossômico é observado em outras espécies de camarões peneídeos, como *P. kerathurus* e *M. japonicus* (Medina *et al.* 1994a), *L. vannamei*, *L. stylirostris* e *L. occidentalis* (Alfaro *et al.* 2007) e *Penaeus monodon* (Fabricius 1798) (Pongtippatee *et al.* 2007).

Em contrapartida, *P. longirostris* (Medina 1994), *P. serrata* (Medina *et al.* 1994b) e *A. longinaris* (Scelzo & Medina 2003) se diferenciam por apresentarem uma protuberância central no capuz acrossômico. Os gêneros *Parapenaeus*, *Penaeopsis*, *Artemesia* e *Metapenaeopsis* são agrupados na tribo Parapeneini. A presença da protuberância no capuz acrossômico dos espermatozóides de camarões desses gêneros é útil para validar a classificação da tribo, confirmando esse como um táxon coerente filogeneticamente (Scelzo & Medina 2003). Demonstrando assim a importância da realização de estudos sobre a ultraestrutura dos espermatozóides das mais diversas espécies para a filogenia de decápodos.

A partir da região central do capuz acrossômico de espermatozóides uniestrelados geralmente é projetado anteriormente um único apêndice pontiagudo, o espinho (Kleve *et al.* 1980, Scelzo & Medina 2003). Em Dendrobranchiata, essa ultraestrutura é responsável pela fixação dos espermatozóides aos ovócitos durante a desova (Clark *et al.* 1980, Medina 1994). O espinho é usualmente ereto, embora possa apresentar curvatura, provavelmente por causa da compactação dos espermatozóides que ocorre ao longo do vaso deferente e que precede a formação do espermatóforo na ampola terminal (Medina 1994). Quando o espermatozóide apresenta o espinho curvo, assim como quebrado ou encurtado, é classificado como anormal (Alfaro 1993). Nestas

condições os espermatozóides de camarões são incapazes de se fixarem ao ovócito (Alfaro 1993, Wang *et al.* 1995).

Nos espermatozóides uniestrelados, o apêndice não é contínuo com o pró-núcleo (Kim *et al.* 2003). A ultraestrutura do espinho do espermatozóide varia de espécie para espécie (Scelzo & Medina 2003). O espinho do espermatozóide de *P. kerathurus*, por exemplo, contém material granular desde a ponta do espinho até a base da vesícula acrossômica (Medina *et al.* 1994a). Em *P. longirostris*, o espinho também é constituído por material granular, contudo a base é constituída por material homogêneo mais denso, que se estende por todo capuz acrossômico, marcando claramente a transição da ponta para a base do espinho (Medina 1994). Em *A. longinarius* e *M. japonicus*, o espinho é constituído por microfilamentos longitudinais (Medina *et al.* 1994a, Scelzo & Medina 2003). A constituição por microfilamentos longitudinais do espinho também é observado no espermatozóide de *F. paulensis*.

A concavidade interna da vesícula acrossômica forma um espaço simples ultraestruturalmente, denominado de região subacrossômica. Essa região situada entre a vesícula acrossômica e o pró-núcleo, separa o capuz acrossômico da cromatina. E compreende um material floculado ou filamento eletronicamente translúcido preenchendo a reentrância posterior da vesícula acrossômica (Medina 1994, Medina *et al.* 1994a, 1994b, Pongtippatee *et al.* 2007).

O espermatozóide de *F. paulensis* está de acordo com o padrão estrutural conhecido em peneídeos, apresentando as características citadas anteriormente para região subacrossômica. No entanto, é observada uma clara diferença entre a morfologia da região subacrossômica do espermatozóide de espécies com e sem protuberância do capuz acrossômico. Nas espécies com protuberância na porção central do capuz

acrossômico (ex. *P. longirostris*, *P. serrata* e *A. longinaris*), o material subacrossômico é fino no centro e estende-se lateralmente acompanhando a protuberância, onde se tornam mais espessos (Medina 1994, Medina *et al.* 1994b, Scelzo & Medina 2003). Nos peneídeos sem protuberância (ex. *P. kerathurus*, *M. japonicus*, *P. monodon*, *L. vannamei*, *L. stylirostris* e *L. occidentalis*), o material subacrossômico não se estende lateralmente (Medina *et al.* 1994a, Alfaro *et al.* 2007, Pongtippatee *et al.* 2007), o mesmo padrão observado para o espermatozóide de *F. paulensis*.

As ultraestruturas do acrossoma de espermatozóide de peneídeos, tais como capuz acrossômico, espinho e região subacrossômica, estão envolvidas na reação acrossômica (Alfaro *et al.* 2003, 2007, Pongtippatee *et al.* 2007) e, portanto, são fundamentais para o êxito da fecundação (Leung-Trujillo & Lawrence 1987b). Para *F. paulensis*, a reação acrossômica do espermatozóide e a interação com o ovócito são desconhecidas. Investigações desta natureza permitiram a identificação de características específicas, além de auxiliarem na elaboração de técnicas que visem o melhoramento da reprodução do camarão-rosa em cativeiro.

CONCLUSÕES

O espermatóforo do camarão-rosa *F. paulensis* é constituído por camadas acelulares, sendo diferenciado em corpo principal e apêndice. O espermatozóide do camarão-rosa é do tipo uniestrelado, sendo constituído por um corpo principal e um único espinho derivado do acrossoma. Os comprimentos do espermatozóide (10,71µm) e do espinho (5,15µm) estão entre os maiores dentre as espécies de Dendrobranchiata já estudadas. O corpo principal do espermatozóide é formado por uma fina camada citoplasmática perinuclear anteriormente, pelo pró-núcleo caracteristicamente formado por cromatina em estado fibrilar e pela porção basal da vesícula acrossômica, composta pelo capuz acrossômico e pela região subacrossômica. O espinho é formado por microfilamentos longitudinais. O comprimento dos espermatozóides e do espinho e as membranas lamelares citoplasmáticas pouco visíveis são as características ultraestruturais do espermatozóide de *F. paulensis*, que o diferencia dos espermatozóides das demais espécies de camarões peneídeos já estudadas.

CAPÍTULO 2 – EFEITO DA ALIMENTAÇÃO NA QUALIDADE ESPERMÁTICA E NA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DOS TECIDOS DE REPRODUTORES DO CAMARÃO-ROSA *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante 1967)

INTRODUÇÃO

O êxito da reprodução de peneídeos em cativeiro é a produção de larvas e pós-larvas de qualidade (Arcos *et al.* 2003b). A qualidade larval, por sua vez, depende da condição dos reprodutores (Racotta *et al.* 2003).

Em sistemas de maturação, os esforços para promover o sucesso reprodutivo de peneídeos têm focado basicamente os estágios de maturação e de desova de fêmeas. Os efeitos de diversos fatores no desempenho reprodutivo de fêmeas têm sido testados. Dentre os fatores investigados estão indução hormonal (Vaca & Alfaro 2000, Wongprasert *et al.* 2006), densidade de estocagem (Coman *et al.* 2007a), exposição à amônia (Cavalli *et al.* 1998), exigências nutricionais (Cahu *et al.* 1995, Marsden *et al.* 1997, Naessens *et al.* 1997, Wouters *et al.* 2001b, Du *et al.* 2006, Coman *et al.* 2007b, Huang *et al.* 2008), entre outros.

Pouca atenção tem sido dada a qualidade reprodutiva dos machos, embora a qualidade desses seja tão importante para produção larval quanto à das fêmeas (Meunpol *et al.* 2005). Os machos são suscetíveis a problemas de fertilidade que comprometem a produção larval (Alfaro 2001). A presença de reprodutores com baixa qualidade espermática resulta em ovos de pouca qualidade, baixas taxas de fertilização e consequentemente baixa produção larval (Meunpol *et al.* 2005).

A redução do desempenho reprodutivo de camarões machos tem varias razões, como a estocagem dos animais em cativeiro por um longo período de tempo e/ou dietas de maturação inapropriadas (Meunpol *et al.* 2005). O tipo de alimento oferecido aos camarões é importante para a maturação sexual dos camarões e para a qualidade larval (Díaz & Fenucci 2004). Camarões alimentados com dietas desbalanceadas ou incompletas apresentam desempenho reprodutivo prejudicado ou mesmo cessam o processo de reprodução (Bray & Lawrence 1992, Wouters *et al.* 2001a).

Alguns estudos indicam que a qualidade espermática pode ser afetada pela alimentação inadequada (Samuel *et al.* 1999). Dietas desbalanceadas favorecem o aparecimento de melanização no espermatóforo que podem evoluir para deterioração do trato reprodutivo, reduzindo o número de espermatozóides e/ou aumentando o número de células anormais e mortas (Díaz *et al.* 2001).

Rotineiramente, o sucesso na maturação em cativeiro tem sido alcançado com dietas à base de organismos marinhos congelados com ou sem o uso de dietas artificiais (Browdy 1992, Harrison 1997, Browdy 1998, Peixoto *et al.* 2005). Os alimentos mais comumente usados são moluscos (lula, ostra, mexilhão), crustáceos (camarão, caranguejo, siri e artemia), peixe (diversos) e poliquetas marinhos (Bray & Lawrence 1992, Rothlisberg 1998).

Os alimentos naturais são selecionados de acordo com sua disponibilidade e preço local. Quanto maior a variedade oferecida, maiores são as chances de alcançar as exigências nutricionais dos camarões na fase de maturação (Wouters *et al.* 2002). Em geral, estes alimentos apresentam elevadas concentrações de ácidos graxos, como os altamente insaturados (HUFAS, sigla em inglês). Os HUFAS estão envolvidos no

desenvolvimento dos sistemas reprodutivo e neural, na produção de biomembranas e na síntese de hormônios esteróides (Harrison 1990).

Entretanto, a utilização de alguns alimentos naturais pode apresentar como desvantagens, flutuação na disponibilidade, valor nutricional inconsistente, deterioração da água e aumento do risco de transmissão de bactérias patógenas e viroses (Harrison 1990, 1997). Por isso, a utilização de dietas artificiais (ração) é indicada, mas a oferta apenas de ração para a fase de maturação pode não apresentar resultados satisfatórios de produção quando comparados a oferta de alimentos frescos congelados (Wouters *et al.* 2002). As vantagens da dieta artificial são manejo fácil, menor trabalho, pois não necessita de preparo, e o menor risco de contaminação (Wouters *et al.* 2002).

Os parâmetros utilizados para avaliar a qualidade reprodutiva geralmente são a quantidade de ovos produzidos por fêmea, taxa de fertilização, taxa de eclosão, taxa de metamorfose de náuplio para protozoa, entre outros. Esses parâmetros podem ser utilizados para testar diferentes alimentos oferecidos para os reprodutores (Cahu *et al.* 1995, Marsden *et al.* 1997, Du *et al.* 2006, Coman *et al.* 2007b, Huang *et al.* 2008). Por meio da análise bioquímica dos tecidos também é possível avaliar o efeito dos diferentes alimentos fornecidos sobre a condição nutricional e reprodutiva dos camarões (Sánchez *et al.* 2001, Racotta *et al.* 2003). Ceballos-Vázquez *et al.* (2004) analisando a composição bioquímica dos tecidos verificou o estado nutricional dos animais e a associou à perda de qualidade espermática.

A maioria dos estudos sobre a composição bioquímica dos tecidos de reprodutores de camarões peneídeos está restrita às fêmeas (Palacios *et al.* 2000, Arcos *et al.* 2003a, Maggioni *et al.* 2004, Vazquez-Boucard *et al.* 2004). Poucos são os estudos sobre a composição bioquímica de machos (Ceballos-Vázquez *et al.* 2004). Para

Farfantepenaeus paulensis, alguns estudos avaliaram a composição bioquímica dos tecidos na espécie (Perazzolo *et al.* 2002, Hollmann *et al.* 2008, Nakayama *et al.* 2008a). No entanto, nenhum desses avaliou a composição bioquímica em reprodutores machos da espécie.

De acordo com o exposto anteriormente, é possível perceber a necessidade de estudos sobre os efeitos dos alimentos oferecidos aos reprodutores machos de *F. paulensis* sobre o desempenho reprodutivo, utilizando a qualidade espermática e a composição bioquímica dos tecidos de reserva como ferramentas para avaliar o estado nutricional dos camarões.

Desta forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito da alimentação sobre a qualidade espermática (peso do espermatóforo, índice espermatoossomático, número de espermatozóides e taxas de melanização e de ausência de espermatóforos) e a composição bioquímica (proteína, triglicerídeos e glicose) dos tecidos (hemolinfa, hepatopâncreas e músculo) de reprodutores de *F. paulensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental

No experimento foram testados três tratamentos: alimento fresco, no qual foram ofertados alternadamente músculos de peixe *Macrodon ancylodon* (Bloch & Schneider 1801), lula *Illex argentinus* (Castellanos 1960) e siri *Callinectes sapidus* (Rathbun 1896); ração, no qual foi ofertada a dieta comercial para maturação Breed S (INVE- Bélgica); e alimento fresco mais ração, no qual foram ofertados alternadamente alimentos frescos e ração. A frequência alimentar foi de duas vezes ao dia (9:00 e 17:00 horas) até saciedade aparente.

Para o experimento 45 machos com peso médio ($\pm$ desvio padrão) de 22,41g ($\pm 1,10$) foram selecionados aleatoriamente dos tanques circulares de maturação após o período de aclimação. Não encontrada diferença significativa entre os pesos médios ($p < 0,05$), os camarões foram distribuídos em tanques de 0,49m², volume útil de 150 litros e aeração constante. Para cada tratamento foram utilizados cinco tanques com três animais por tanque, totalizando 15 animais por tratamento.

Durante o período experimental, de 40 dias, os parâmetros da água foram mantidos em temperatura média de 27°C ($\pm 1,67$), com salinidade a 33 ($\pm 1,69$) e concentração média de oxigênio dissolvido de 6,66mg.l⁻¹ ($\pm 0,06$). O fotoperíodo foi de 14 horas luz e 10 horas de escuro. Os restos de alimento, exúvias e animais mortos foram removidos dos tanques diariamente. Os animais mortos foram contabilizados para cálculo da sobrevivência final por tratamento.

Composição proximal e qualidade espermática

A análise centesimal dos alimentos frescos testados, lula, peixe e siri, foi realizada no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, RS, seguindo o método descrito em AOAC (2000). A composição da ração foi obtida a partir das informações fornecidas pelo fabricante. Proteína bruta (P), lipídios (L), cinzas (C) e extrativos não nitrogenados (ENN), que consiste da quantidade de fibra mais a de carboidrato, foram determinados a partir do peso seco dos alimentos. O ENN foi calculado pela fórmula:

$$\text{ENN} = 100 - P - L - C$$

Sendo:

100= percentual total do peso seco;

P= concentração de proteína bruta;

L= concentração de lipídios;

C= concentração de cinzas.

A qualidade espermática foi avaliada considerando os parâmetros peso do espermatóforo, índice espermatoossomático, número de espermatozóides, melanização e ausência de espermatóforo. Esses dados foram coletados no início (dia zero) e no fim (dia 40) do período experimental. Inicialmente todos os camarões foram submetidos à avaliação da qualidade espermática. Ao final do período experimental, oito animais de cada tratamento foram avaliados.

Os espermatóforos de ambos os lados foram extrusados manualmente pela compressão da região latero-ventral, posterior à inserção do quinto par de pereiópodos (Petersen *et al.* 1996) e pesados em balança de precisão de 0,001g (Sartorius MC1 Analytic AC210S). A escolha dos espermatóforos a serem analisados foi feita de forma aleatória.

Para o cálculo do índice espermatoossomático (IES) foi utilizada a fórmula:

$$\text{IES} = (\text{peso do espermatóforo em g} / \text{peso corporal em g}) \times 100.$$

A melanização e a ausência de espermatóforos foram observadas por exame visual do quinto par de pereiópodos. Posteriormente, foram obtidas as percentagens de melanização e ausência de espermatóforos.

Os espermatóforos foram macerados e homogeneizados em 2ml de solução fisiológica para *F. paulensis* (solução salina; a composição química da mesma está detalhada no Apêndice 2). Uma alíquota da solução resultante da maceração do espermatóforo foi adicionada a um hematocítômetro (câmara de Neubauer). Com o auxílio de um microscópio óptico foi contado o número de espermatozóides presentes

em cinco das 25 quadrículas de um campo da câmara de Neubauer, de acordo com o método descrito por Leung-Trujillo & Lawrence (1987a). O número de espermatozóides por espermatóforo (N°E) foi estimado por meio da seguinte fórmula:

$$N^{\circ}E = A \times Q \times V \times 10^4$$

Sendo:

A= número médio de células contadas;

Q= número total de quadrículas da câmara de Neubauer (25);

V= volume total da solução salina (2ml);

10^4 = fator de multiplicação da câmara de Neubauer (transformação de mm^3 para ml).

Coleta de material biológico

As amostras de hepatopâncreas e de músculo foram coletados de animais crioadestesiados por dissecação. O hepatopâncreas foi pesado em balança de precisão de 0,001g (Sartorius MC1 Analytic AC210S). A hemolinfa foi coletada com seringa de 1ml com agulha de 0,3mmx12,7mm (30G x ½”). Todo material biológico foi mantido a -20°C até o processamento das análises bioquímicas.

Para o cálculo do índice hepatossomático (IHS) foi utilizada a seguinte fórmula:

$$IHS = (\text{peso do hepatopâncreas em g} / \text{peso corporal em g}) \times 100.$$

Análises bioquímicas

As análises foram realizadas no Laboratório de Determinações do Instituto de Ciências Biológicas da FURG. Os tecidos utilizados para a análise bioquímica de proteína, triglicerídeos e glicose, foram hemolinfa, hepatopâncreas e músculo.

Para determinação bioquímica foram utilizados kits colorimétricos enzimáticos comerciais (Dole reagentes Ltda., Goiânia, GO). Método Biureto para quantificação de proteína, 4-antipirilquinonimina para triglicerídeos e glicose oxidase para glicose.

Subamostras de 200mg de hepatopâncreas e músculo foram maceradas e homogeneizadas em 2ml de solução salina. Subsequentemente, as amostras de hepatopâncreas e de músculo foram centrifugadas a 6600g durante 10 minutos a 5°C (Sigma, Alemanha; modelo 3K30) para coleta do sobrenadante. Os tubos de eppendorfs contendo hemolinfa foram centrifugados a 10000g durante 5 minutos a 4°C (Hettchi, Alemanha; modelo Mickro 22 R) para coleta de sobrenadante.

Para a dosagem de glicose foram utilizados 200µl do sobrenadante das amostras centrifugadas inicialmente e adicionados a 500µl de citrato de sódio. A solução resultante foi mantida em repouso durante 5 minutos a 100°C e depois centrifugada a 12800g durante 15 minutos (Sigma, Alemanha; modelo 3K30). Após a centrifugação foram coletados 20µl do sobrenadante resultando da centrifugação para a leitura das absorbâncias da glicose nos tecidos. As leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro (Biotek, Vermont, EUA; modelo ELX800). Os comprimentos de onda para leitura das absorbâncias de proteína, triglicerídeos e glicose foram de 550, 510 e 510nm, respectivamente.

Análise dos dados

Para realizar as análises estatísticas, os valores de sobrevivência em porcentagens foram transformados em raiz quadrada do arco seno. Antes das análises de variância, as premissas normalidade e homocedasticidade foram verificadas.

Análises de variância (One-way ANOVA) foram usadas para identificar diferenças significativas de valores médios dos parâmetros da qualidade espermática entre o início e o fim do experimento e entre tratamentos. Para os valores do peso do hepatopâncreas, dos índices espermatoossomático e hepatossomático, da sobrevivência e da bioquímica da hemolinfa, hepatopâncreas e músculo estas análises foram usadas somente para comparação entre tratamentos. Quando diferenças significativas foram encontradas, a ANOVA foi seguida pelo teste post-hoc de Tukey. Todas as análises estatísticas foram executadas ao nível de significância de $p < 0,05$ no aplicativo STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc. 2004, Tulsa, Oklahoma, USA).

RESULTADOS

Os maiores níveis de proteína bruta foram registrados para peixe (95,74%) e lula (86,23%), seguidos da ração (aproximadamente 60%) e do siri (40,47%). Quanto ao nível de lipídio, a ração apresentou o maior valor, com aproximadamente 11%, seguido por siri (4,99%), lula (4,74%) e peixe (0,49%). O nível de cinzas em siri foi alto (39,30%), na ração foram registrados aproximadamente 11% e na lula e no peixe os níveis foram menores (5,53% e 4,66%, respectivamente). Siri e ração apresentaram valores elevados de ENN (cerca de 18% e 15,24%, respectivamente), enquanto os demais ingredientes apresentaram valores mais baixos (3,5% do peso seco de lula e 0,84% do peso seco do peixe) (Tab. 3).

Tabela 3: Composição centesimal (%) dos alimentos (peso seco) oferecidos ao camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* durante o período experimental.

	Proteína	Lipídios	Cinza	ENN
Ração	Aprox. 60	Aprox. 11	Aprox. 11	Aprox. 18
Lula	86,23	4,74	5,53	3,5
Peixe	95,74	0,49	4,66	0,84
Siri	40,47	4,99	39,30	15,24

Aprox.: aproximadamente; ENN: extrativos não nitrogenados.

A sobrevivência média final dos camarões dos tratamentos alimento fresco e alimento fresco mais ração foi de $86,66 \pm 18,25\%$ em ambos os tratamentos. O tratamento ração apresentou sobrevivência média de $50 \pm 28,86\%$. Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,64$) (Tab. 4).

No início do experimento, os pesos dos camarões não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,16$), sendo registrada média de $21,16 \pm 2,08\text{g}$ para alimento fresco, $22,84 \pm 3,19\text{g}$ para ração e $23,24 \pm 3,78\text{g}$ para alimento fresco mais ração. Após o período experimental, não houve diferença no peso dos camarões em relação ao início do experimento ($p = 0,63$). Os camarões terminaram o experimento pesando em média $21,18 \pm 2,97\text{g}$ no tratamento alimento fresco, $22,82 \pm 3,65\text{g}$ no tratamento ração e $22,76 \pm 3,75\text{g}$ no alimento fresco mais ração, não havendo diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,46$) (Tab. 4).

O peso médio do espermatóforo, no dia zero, foi de $22\text{mg} (\pm 3)$ para o tratamento alimento fresco; de $24\text{mg} (\pm 6)$ para ração; e de $27\text{mg} (\pm 8)$ para alimento fresco mais ração. No dia 40, em todos os tratamentos houve perda significativa ($p = 0$) de peso em relação ao início, sendo registrado $16 \pm 3\text{mg}$ para alimento fresco, $15 \pm 1\text{mg}$ para ração e $18 \pm 5\text{mg}$ para alimento fresco mais ração. Não houve diferença estatística ($p = 0,60$) entre os tratamentos após o período experimental (Tab. 4).

Tabela 4: Sobrevivência, qualidade espermática e peso do hepatopâncreas dos machos do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* alimentados com alimento fresco, ração e alimento fresco mais ração (médias $\pm$ desvio padrão).

PARÂMETROS		Alimento Fresco	Ração	Alimento fresco mais ração
Sobrevivência (%)	Inicial	-	-	-
	Final	86,66 $\pm$ 18,25 ^a	50 $\pm$ 28,86 ^a	86,66 $\pm$ 18,25 ^a
Peso do camarão (g)	Inicial	21,16 $\pm$ 2,08 ^a	22,84 $\pm$ 3,19 ^a	23,24 $\pm$ 3,78 ^a
	Final	21,18 $\pm$ 2,97 ^a	22,82 $\pm$ 3,65 ^a	22,76 $\pm$ 3,75 ^a
Peso do espermátóforo (mg)	Inicial	22 $\pm$ 3 ^a	24 $\pm$ 6 ^a	27 $\pm$ 8 ^a
	Final	16 $\pm$ 3 ^b	15 $\pm$ 1 ^b	18 $\pm$ 5 ^b
Número de espermatozóides ($\times 10^6$)	Inicial	6,00 $\pm$ 4,91 ^a	3,37 $\pm$ 2,59 ^a	5,85 $\pm$ 4,29 ^a
	Final	4,89 $\pm$ 1,80 ^a	4,26 $\pm$ 3,17 ^a	3,40 $\pm$ 2,22 ^a
Melanização (%)	Inicial	0	0	0
	Final	15,38	42,85	12,51
Ausência de espermátóforos (%)	Inicial	0	0	0
	Final	0	42,85	37,50
Peso do hepatopâncreas (mg)	Inicial	-	-	-
	Final	367 $\pm$ 135 ^a	596 $\pm$ 98 ^b	445 $\pm$ 156 ^{a,b}

Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

No tratamento alimento fresco, no início do experimento, foi estimada uma média de $6 \times 10^6 \pm 4,91 \times 10^6$ espermatozóides.espermátóforo⁻¹; no final, esse número foi de $4,89 \times 10^6 \pm 1,80 \times 10^6$ espermatozóides.espermátóforo⁻¹. No tratamento ração, $3,37 \times 10^6 \pm 2,59 \times 10^6$ espermatozóides foram estimadas por espermátóforo no início do experimento; e $4,26 \times 10^6 \pm 3,17 \times 10^6$ espermatozóides.espermátóforo⁻¹ no final. No tratamento alimento fresco mais ração, inicialmente cada espermátóforo continha em

média $5,85 \times 10^6 \pm 4,29 \times 10^6$ espermatozóides e após os 40 dias foi estimado cerca de $3,40 \times 10^6 \pm 2,22 \times 10^6$ espermatozóides/espermatóforo⁻¹. O número de espermatozóides não apresentou diferença nem entre o início e o fim do experimento ($p = 0,76$) nem entre os tratamentos ($p = 0,34$) (Tab. 4).

A variação das percentagens de melanização e de ausência de espermatóforo apresentada ao longo do experimento nos três tratamentos é mostrada na tabela 4. No início do experimento não foi observada melanização nem ausência de espermatóforo nos animais.

Quanto à melanização, no final do experimento, em todos os tratamentos foram registrados camarões com espermatóforos melanizados. Contudo, animais alimentados apenas com ração apresentaram a maior taxa de melanização, 42,85%. No tratamento alimento fresco 15,38% dos camarões apresentaram melanização nos espermatóforos e no tratamento alimento fresco mais ração, 12,51%.

No final do período experimental, nos tratamentos ração e alimento fresco mais ração, foram registrados percentuais de ausência de espermatóforo de 42,85% e 37,50%, respectivamente. Enquanto que no tratamento alimento fresco, ao final do experimento, todos os animais apresentaram espermatóforo.

O peso do hepatopâncreas foi significativamente ($p = 0,01$) maior nos camarões alimentados com ração ($596 \pm 98\text{mg}$) em relação aqueles alimentados apenas com alimento fresco ($367 \pm 135\text{mg}$). O valor médio do peso do hepatopâncreas dos machos alimentados com alimento fresco mais ração ($445 \pm 156\text{mg}$) não apresentou diferença significativa em relação aos valores registrados nos tratamentos alimento fresco ($p = 0,48$) e ração ($p = 0,11$) (Tab. 4).

Os valores médios dos índices espermatoossomático e hepatossomático não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos ($p_{IES} = 0,45$; $p_{IHS} = 0,07$), embora tenham apresentado tendência de variação com padrões inversos. A média do índice espermatoossomático, no dia 40, foi menor no tratamento ração ($0,064 \pm 0,00038$) em relação aos tratamentos alimento fresco ($0,079 \pm 0,015$) e alimento fresco mais ração ($0,078 \pm 0,018$). A média do índice hepatossomático foi maior ($2,25 \pm 0,80$) no tratamento ração em relação aos tratamentos alimento fresco ($1,90 \pm 0,94$) e alimento fresco mais ração ($1,92 \pm 0,50$) (Fig. 7).

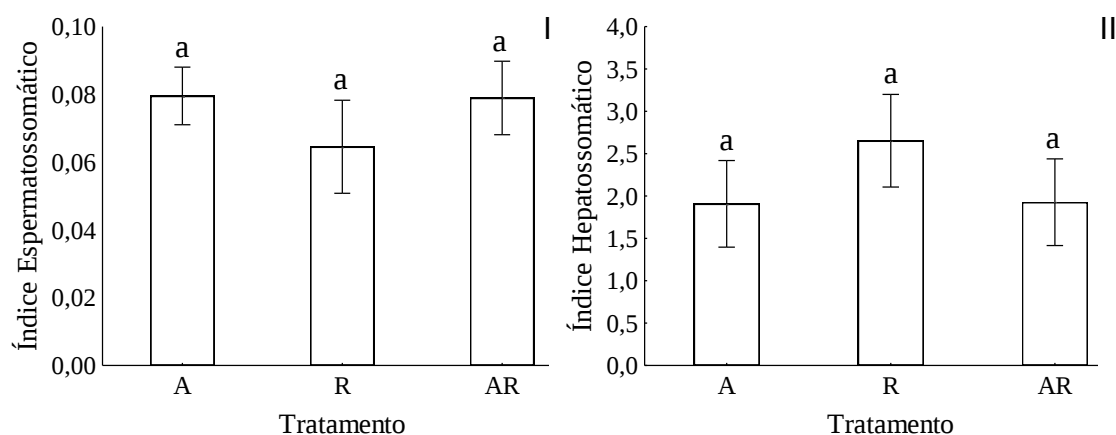


Figura 7: Índices espermatoossomático (I) e hepatossomático (II) dos camarões-rosa *Farfantepenaeus paulensis* alimentados com alimento fresco (A), ração (R) e alimento fresco mais ração (AR). As barras verticais indicam o desvio padrão da média e letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

No tratamento ração, a concentração de proteína na hemolinfa não diferiu entre os tratamentos ($p = 0,65$) e os valores médios foram de $53,21 \pm 14,02 \text{ mg.dl}^{-1}$ para alimento fresco, $53,09 \pm 12,29 \text{ mg.dl}^{-1}$ para ração e $46,49 \pm 16,83 \text{ mg.dl}^{-1}$ para alimento fresco mais ração. Os triglicerídeos na hemolinfa também não diferiram significativamente entre tratamentos ($p = 0,04$), sendo os valores médios de $21,46 \pm 11,44 \text{ mg.dl}^{-1}$ no tratamento alimento fresco, $34,43 \pm 8,79 \text{ mg.dl}^{-1}$ no tratamento

ração e $26,13 \pm 23,60 \text{mg.dl}^{-1}$ no tratamento alimento fresco mais ração. A concentração de glicose na hemolinfa foi significativamente maior no tratamento ração ($31,19 \pm 14,40 \text{mg.dl}^{-1}$) do que nos alimento fresco ($12,24 \pm 5,18 \text{mg.dl}^{-1}$; $p = 0,01$) e alimento fresco mais ração ($10,97 \pm 3,76 \text{mg.dl}^{-1}$; $p = 0,01$) (Tab. 5).

Tabela 5: Composição bioquímica da hemolinfa, hepatopâncreas e músculo dos machos do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* alimentados com alimento fresco, ração e alimento fresco mais ração (médias $\pm$ desvio padrão).

	Alimento Fresco	Ração	Alimento fresco mais ração
Hemolinfa			
Proteína (mg.dl^{-1})	$53,21 \pm 14,02^a$	$53,09 \pm 12,29^a$	$46,49 \pm 16,83^a$
Triglicerídeos (mg.dl^{-1})	$21,46 \pm 11,44^a$	$34,43 \pm 8,79^a$	$26,13 \pm 23,60^a$
Glicose (mg.dl^{-1})	$12,24 \pm 5,18^a$	$31,19 \pm 14,40^b$	$10,97 \pm 3,76^a$
Hepatopâncreas			
Proteína (mg.g^{-1})	$49,02 \pm 31,25^a$	$109,44 \pm 45,86^a$	$92,62 \pm 112,54^a$
Triglicerídeos (mg.g^{-1})	$20,82 \pm 19,89^a$	$46,03 \pm 19,15^a$	$40,08 \pm 37,13^a$
Glicose (mg.g^{-1})	$2,26 \pm 1,51^a$	$4,68 \pm 1,52^b$	$4,19 \pm 2,43^{a,b}$
Músculo			
Proteína (mg.g^{-1})	$53,57 \pm 7,03^a$	$68,20 \pm 35,33^a$	$60,02 \pm 22,77^a$
Triglicerídeos (mg.g^{-1})	$1,66 \pm 1,21^a$	$1,37 \pm 1,08^a$	$1,25 \pm 0,58^a$
Glicose (mg.g^{-1})	$0,74 \pm 0,38^a$	$1,03 \pm 0,36^a$	$0,51 \pm 0,41^a$

Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

No hepatopâncreas, a concentração média de proteína não apresentou diferença significativa ($p = 0,18$) entre os tratamentos alimento fresco ($49,02 \pm 31,25 \text{mg.g}^{-1}$), ração ($109,44 \pm 45,86 \text{mg.g}^{-1}$) e alimento fresco mais ração ($92,62 \pm 112,54 \text{mg.g}^{-1}$). O mesmo foi para os triglicerídeos no hepatopâncreas ($p = 0,17$), sendo as concentrações médias de

$20,82 \pm 19,89 \text{mg.g}^{-1}$ no tratamentos alimento fresco, $46,03 \pm 19,15 \text{mg.g}^{-1}$ no tratamento ração e $40,08 \pm 37,13 \text{mg.g}^{-1}$ no tratamento alimento fresco mais ração (Tab. 5).

A concentração de glicose no hepatopâncreas nos camarões alimentados apenas com ração ($4,68 \pm 1,52 \text{mg.g}^{-1}$) foi significativamente maior ($p = 0,02$) do que naqueles alimentados com alimento fresco ($2,26 \text{mg.g}^{-1} \pm 1,51$). No tratamento alimento fresco mais ração ($4,19 \pm 2,43 \text{mg.g}^{-1}$), o valor médio do nível de glicose não apresentou diferença significativa em relação aos demais tratamentos ($p_{\text{alimento fresco}} = 0,05$; $p_{\text{ração}} = 0,62$) (Tab. 5).

No músculo, nenhum dos componentes bioquímicos analisados apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($p_{\text{proteína}} = 0,79$; $p_{\text{triglicerídeos}} = 0,71$; $p_{\text{glicose}} = 0,05$). A concentração média de proteína foi de $53,57 \pm 7,03 \text{mg.g}^{-1}$ no tratamento alimento fresco, $68,20 \pm 35,33 \text{mg.g}^{-1}$ no tratamento ração e $60,02 \pm 22,77 \text{mg.g}^{-1}$ no tratamento alimento fresco mais ração. Os triglicerídeos foram próximos nos três tratamentos ($1,66 \pm 1,21 \text{mg.g}^{-1}$ para alimento fresco; $1,37 \pm 1,08 \text{mg.g}^{-1}$ para ração; e $1,25 \pm 0,58 \text{mg.g}^{-1}$ para alimento fresco mais ração). Os valores médios de glicose foram $0,74 \pm 0,38 \text{mg.g}^{-1}$ para o tratamento alimento fresco, $1,03 \pm 0,36 \text{mg.g}^{-1}$ para ração e $0,51 \pm 0,41 \text{mg.g}^{-1}$ para alimento fresco mais ração. (Tab. 5).

DISCUSSÃO

A formulação de dietas balanceadas é fundamental para o sucesso da reprodução (Racotta *et al.* 2003). Uma dieta equilibrada de maturação deve conter os componentes essenciais nas devidas proporções (Meunpol *et al.* 2005).

Estudos com alimentação e nutrição para *F. paulensis* têm sido realizados, contudo, para pós-larvas e juvenis do camarão (Thompson *et al.* 2002, Ballester *et al.* 2003, Pontes & Andreta 2003, Martins *et al.* 2006, Abreu *et al.* 2007, Fróes *et al.* 2007, Abe *et al.* 2008). Em relação aos reprodutores de *F. paulensis*, a alimentação é composta por alimentos frescos e ração, e essa diversidade de alimento tem possibilitado a desova da espécie em cativeiro (Peixoto *et al.* 2005).

Dos compostos orgânicos presentes nas dietas de camarões peneídeos, os lipídios e as proteínas são abordados com maior frequência e relacionados ao processo de maturação das gônadas (Samuel *et al.* 1999, Wouters *et al.* 2002, Perez-Velazquez *et al.* 2003, Meunpol *et al.* 2005, Goimier *et al.* 2006, Coman *et al.* 2007b). Estes componentes são os mais abundantes nos alimentos, sendo aproveitados na biossíntese e mobilizados intensamente na fase de maturação (Harrison 1990).

No caso dos machos, um dos papéis da proteína está relacionado à composição do espinho do espermatozóide (Goimier *et al.* 2006). Como o espermatozóide do camarão não possui motilidade, a fixação do gameta masculino ao ovócito é feita pelo espinho, ocorrendo em seguida a liberação do material genético masculino na fecundação (Dall *et al.* 1990). A ausência do espinho caracteriza uma anomalia morfológica do espermatozóide comprometendo a qualidade espermática (Goimier *et al.* 2006).

Goimier *et al.* (2006) propuseram uma percentagem mínima de proteína na alimentação de *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus 1767) para as diferentes fases de vida, sendo 40% de proteína para pós-larvas, 30% para juvenis e 45% para machos adultos. E consideraram ainda as porcentagens de proteína, para os adultos, suficientes para um satisfatório desempenho na qualidade espermática.

Dentre os itens alimentares utilizados no presente estudo, siri foi o único a apresentar nível de proteína inferior ao proposto pelos autores acima citados (40,47%). Os demais itens apresentaram concentrações de proteína superiores a 45%, com destaque para lula e peixe que contiveram 86,23% e 95,74% de proteína do total do peso seco, respectivamente.

Quanto aos lipídios, o grupo mais importante para os processos de maturação e reprodução de camarões é dos ácidos graxos, pois esse grupo de lipídios está presente em elevadas concentrações nas gônadas maduras e no vitelo (Harrison 1990). Os ácidos graxos podem ser saturados e insaturados (Lehninger 1986). Os insaturados são subdivididos ainda em poliinsaturados e altamente insaturados, PUFAS e HUFAS (siglas em inglês), respectivamente, e são fundamentais para o desenvolvimento do sistema reprodutivo de camarões (Bray & Lawrence 1992, Browdy 1992, Harrison 1997, Wouters *et al.* 2001a).

Em reprodutores de *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931), a exigência de lipídios totais é por volta de 9%. Para *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson 1874), por sua vez, o desempenho reprodutivo satisfatório tem sido obtido utilizando dietas com 11% de lipídios totais (Wouters *et al.* 2001a). Dos ingredientes utilizados no presente estudo, a ração foi o item que apresentou valor próximo aos indicados anteriormente para

camarões peneídeos (9-11% de lipídios). Os demais itens apresentaram valores inferiores de lipídios totais, 0,49% para peixe, 4,79% para lula e 4,99% para siri.

A diferença de constituição protéica e lipídica entre os ingredientes utilizados neste estudo reforça a necessidade de diversificação dos alimentos para a melhor composição da dieta praticada em laboratório, visando à suplementação ideal para a maturação das gônadas. Essa diversificação de alimentos frescos fornecidos alternadamente com a dieta seca, explica o sucesso da maturação de peneídeos em cativeiro até os dias atuais. Embora a utilização da ração seja preconizada, a realização de maturação das gônadas em cativeiro oferecendo apenas ração, em geral, não é bem sucedida (Wouters *et al.* 2001a).

Em *Fenneropenaeus indicus* (Edwards 1837), o desempenho reprodutivo de camarões alimentados apenas com ração é pior em relação àqueles alimentados apenas com mexilhão (Cahu *et al.* 1995). Em *Fenneropenaeus chinensis* (Osbeck 1765) não há diferença de desempenho reprodutivo entre camarões alimentados apenas com ração e camarões alimentados apenas com moluscos (Xu *et al.* 1994). Em *Penaeus monodon* (Fabricius 1798), em contrapartida, uma dieta formulada totalmente com ração apresenta desempenho reprodutivo melhor do que uma dieta formulada com mexilhão e fígado de bezerro (Marsden *et al.* 1997).

A oferta de uma dieta balanceada é importante para a reprodução de camarões (Bray & Lawrence 1992, Browdy 1992, Wouters *et al.* 2001a). Uma dieta adequada permite o acúmulo de reservas energéticas (Harrison 1990), as quais garantirão a produção de gametas de qualidade, (Harrison 1990, Goimier *et al.* 2006) e, conseqüentemente, de pós-larvas também de boa qualidade (Harrison 1997, Racotta *et al.* 2003).

Os estudos sobre a qualidade espermática de reprodutores de *F. paulensis* são escassos (Costa 1992, Cavalli *et al.* 1997, Peixoto *et al.* 2004b, Nakayama *et al.* 2008b). Mas alguns padrões foram observados, como por exemplo, na classe de peso de 20-27g, geralmente o peso de espermatóforo varia de 7 a 18mg e a quantidade de espermatozóides está entre 1,2-3,7 milhões por espermatóforo. Essa mesma classe de peso é a indicada para a reprodução em cativeiro (Cavalli *et al.* 1997).

No presente estudo, os espermatóforos foram inicialmente mais pesados, com 24 ± 2 mg em média, e no final apresentaram pesos médios (16 ± 1 mg) semelhantes aos obtidos nos estudos supracitados. O número médio de espermatozóides inicial ($5,07 \times 10^6 \pm 1,47 \times 10^6$) e final ($4,18 \times 10^6 \pm 0,74 \times 10^6$), por sua vez, foi maior.

Esses parâmetros podem variar de acordo com a espécie, origem, idade, peso e/ou estágio de maturação do camarão (Alfaro 1993, Díaz *et al.* 2001). No presente estudo a espécie utilizada e a classe de peso ($22,41 \pm 1,10$ g) foram as mesmas utilizadas por Cavalli *et al.* (1997), por isso as diferenças dos valores de peso do espermatóforo e de número de espermatozóides entre os estudos podem ser atribuídas a diferentes idades, estágios de maturação gonadal dos animais e lote de captura de cada experimento. A variação é aparentemente mais ampla do que nos trabalhos anteriores, mas ainda com proximidade do padrão para caracterização da espécie.

Outro atributo da qualidade espermática, além da quantidade de espermatozóides, é o processo de melanização dos espermatóforos. Esse processo pode ser resultante de: infecção bacteriana (Talbot *et al.* 1989, Alfaro *et al.* 1993), temperaturas elevadas (Pascual *et al.* 1998, Pascual *et al.* 2003a, Perez-Velazquez *et al.* 2001, Sánchez *et al.* 2001), dieta desbalanceada (Goimier *et al.* 2006) ou simplesmente

falta da transferência do espermatóforo para fêmeas (Parnes *et al.* 2006), entre outros fatores.

A melanização pode evoluir para deterioração do espermatóforo, alcançando o trato reprodutivo. A melanização no espermatóforo está relacionada à perda de qualidade espermática geralmente, com redução progressiva do número de espermatozóides e pelo aumento das percentagens de células anormais e mortas (Díaz *et al.* 2001). Talbot *et al.* (1989) denominaram este fenômeno como Síndrome Degenerativa do Trato Reprodutivo de Machos (MRTDS, sigla em inglês).

Alfaro *et al.* (1993), no entanto, demonstraram que a melanização dos espermatóforos e do trato reprodutivo pode ser resultado de duas síndromes distintas. Segundo estes autores, a Melanização do Sistema Reprodutivo do Macho (MRSM, sigla em inglês) é a síndrome associada a infecções causadas por microorganismos como as bactérias oportunistas, *Vibrio alginolyticus* (Miyamoto *et al.* 1961), *Pseudomonas putrefaciens* (Derby & Hammer 1931) e outras. Enquanto, a MRTDS está associada a problemas endócrinos ocasionados pelo estresse induzido pelo cultivo (Pascual *et al.* 1998). A melanização teria então duas possíveis causas, uma patológica com agente infectante e a outra resultante de processos fisiológicos atribuídos a um quadro de estresse.

Em crustáceos, a melanização possui importante papel no sistema imunológico. A melanina é uma molécula tóxica produzida pelo sistema profenoloxidase (proPO) (Alfaro *et al.* 1993). A proPO é uma pró-enzima inativa que ocorre na hemolinfa e é ativada para fenoloxidase (PO) quando esta reage com lipopolissacarídeos bacterianos, uréia, íons cálcio, calor, entre outros. A PO é responsável pela síntese da melanina

(Sarathi *et al.* 2007), que é depositada em locais próximos a invasão de microorganismos em caso de MRSM (Vargas-Albores & Yepiz-Plascencia 2000).

Sánchez *et al.* (2001) propuseram a seguinte sequência para explicar o aparecimento da MRTDS em camarões machos: 1. Em condições de cultivo, o estresse nutricional é presente e juntamente a outros fatores (ex. temperatura) produz estresse fisiológico nos camarões; 2. Esse estresse reduz a capacidade imunológica pela redução de hemócitos, alterando os mecanismos de regulação do proPO; 3. Essa alteração produz um aumento na atividade do sistema de proPo, que aumenta a produção de melanina; 4. O aumento de melanina, por fim, produz degeneração das células e por fim a esterilização dos machos.

A sequência sugerida por Sánchez *et al.* (2001) demonstra a importância que deve ser dada à presença da melanização, sobretudo se os animais são destinados à produção pós-larvas em cativeiro. Para a manutenção da qualidade dos reprodutores, os cuidados devem ser tomados no início das atividades em sistemas de maturação. Durante a seleção dos machos destinados à maturação, deve ser priorizada a escolha de animais aparentemente saudáveis, sem necroses na carapaça e sem áreas melanizadas no trato reprodutivo (ampola terminal e espermatóforo), com presença de todos os apêndices e espermatóforos, entre outros.

No presente estudo, inicialmente nenhum dos animais apresentou melanização ou áreas melanizadas. Mas no fim do período experimental em todos os tratamentos os animais apresentaram espermatóforos melanizados, sendo o tratamento ração com maior taxa de melanização (42,85%). Nos demais tratamentos em que itens frescos foram incluídos, as taxas de melanização foram menores (15,38% para alimento fresco e 12,51% para alimento fresco mais ração).

A partir da melanização de espermatóforos observada em todos os tratamentos é possível inferir que, ao final do experimento, houve desgaste dos camarões devido à permanência em cativeiro. No entanto, o tipo de alimento oferecido aparentemente também contribuiu para os resultados encontrados no presente estudo. A maior taxa de melanização registrada no tratamento ração, por exemplo, pode ser atribuída ao fator alimentação, tendo em vista as menores taxas de melanização registradas nos demais tratamentos.

No entanto, a partir da sequência de eventos proposta por Sánchez *et al.* (2001) para explicar a progressão da melanização, pode-se inferir que o processo de degeneração dos espermatóforos do tratamento ração estava no início. A utilização de dieta inadequada foi suficiente para aumentar a quantidade de melanina produzida, mas não para diminuir o número de espermatozoides contidos nos espermatóforos. Isto porque, mesmo apresentando a maior taxa de melanização, a quantidade de espermatozoides dos espermatóforos não apresentou diferença significativa em relação aos demais tratamentos.

No presente trabalho, o tratamento ração também apresentou a maior taxa de ausência de espermatóforo (42,8%). Nos demais tratamentos os valores foram inferiores ou ainda o espermatóforo estava presente em todos os animais como no tratamento alimento fresco.

Alguns autores atribuem a ausência de espermatóforos ao processo natural de degeneração (Alfaro & Lozano 1993). A degeneração dos espermatóforos está associada ao ciclo de muda (Heitzmann *et al.* 1993, Parnes *et al.* 2006). Parnes *et al.* (2006), por exemplo, observaram que os espermatóforos são absorvidos pelo organismo do animal cerca de 24h antes da muda, sendo formado outro logo após o processo de

muda ser completado. A renovação do espermatóforo pode ser feita a cada duas ou três semanas (Pascual *et al.* 1998). Entretanto, esse período pode ser reduzido por condições inapropriadas de cultivo, inclusive fatores nutricionais (Leung-Trujillo & Lawrence 1987b, Ceballos-Vázquez *et al.* 2004).

A melanização do espermatóforo e a ausência de espermatóforo registradas em todos os tratamentos no presente estudo, provavelmente são resultantes do desgaste de cativeiro. Contudo, problemas nutricionais possivelmente atuaram acelerando a degeneração natural dos espermatóforos. Os resultados obtidos para o tratamento ração corroboram esta hipótese, uma vez que nesse a perda foi mais acentuada, tendo em vista a melanização e a ausência de espermatóforos. Os resultados do peso do hepatopâncreas e dos índices espermatossomático e hepatossomático podem ainda explicar parte do ocorrido no experimento quanto aos diferentes alimentos utilizados.

O hepatopâncreas é uma glândula pertencente ao intestino médio de crustáceos (Ruppert & Barnes 2005). Essa glândula desempenha importante função na assimilação, degradação e absorção dos nutrientes, representando o principal reservatório de energia utilizada para o crescimento, maturação das gônadas e metabolismo de crustáceos decápodos (Papa 2007, Palacios *et al.* 2000).

Nesse processo, os metabólitos, como glicose e triglicerídeos, são transportados do hepatopâncreas para a gônada por meio da hemolinfa (Pérez-Jar 2005). Kulkarni & Nagabhushanam (1979) observaram uma diminuição significativa de glicogênio e ácidos graxos no hepatopâncreas durante a maturação do ovário e a espermatogênese de *Parapenaeopsis hardwickii* (Miers 1878) e um aumento simultâneo desses nutrientes no ovário e nos testículos. Portanto, o peso do hepatopâncreas está relacionado ao estágio de desenvolvimento das gônadas e ao gasto de energia,

direcionado para o crescimento ou para a maturidade sexual (Papa 2007). Sureshkumar & Kurup (1999), por exemplo, registraram correlação negativa entre o peso do hepatopâncreas e a maturidade gonadal em machos adultos de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879).

No presente estudo, os hepatopâncreas dos machos do tratamento ração foram em média significativamente mais pesados do que os do tratamento alimento fresco. Os índices espermatossomático e hepatossomático apresentaram tendência de variação com padrões inversos. Essa variação sugere a transferência de nutrientes do hepatopâncreas para a formação do espermatóforo.

No tratamento ração, como já mencionado, as exigências nutricionais aparentemente não foram atingidas, tendo em vista as maiores porcentagens de melanização e ausência de espermatóforo observadas nesse tratamento. Por isso, no tratamento ração, o processo de reprodução foi preterizado, havendo menor transferência de nutrientes do hepatopâncreas para a formação do espermatóforo em relação aos demais tratamentos. Assim, o índice hepatossomático e o peso da glândula foram maiores à medida que o índice espermatossomático foi menor.

Considerando os mesmos parâmetros de qualidade espermática, melanização e ausência de espermatóforo, os camarões dos tratamentos alimento fresco e alimento fresco mais ração estavam aparentemente em melhores condições nutricionais. Nesses foi observado, então, padrão inverso em relação ao tratamento ração. Assim, tendo em vista as melhores condições nutricionais dos camarões, a reprodução foi mantida, sendo registrados valores menores do peso do hepatopâncreas e índice hepatossomático e valores maiores do índice espermatossomático.

Os resultados das análises bioquímicas realizadas nos tecidos (hemolinfa, hepatopâncreas e músculo) também são úteis para corroborar a hipótese de que no tratamento ração as exigências nutricionais não foram atingidas. As concentrações de proteína total em tecidos podem ser afetadas pela baixa disponibilidade energética, como ocorre durante inanição, muda ou alimentação de baixa qualidade (Mercier *et al.* 2006), sendo importante, portanto, considerar o nível de proteína na dieta (Cedeño *et al.* 2000, Pascual *et al.* 2003b). No entanto, nenhum padrão foi observado no presente estudo entre os níveis de proteína contidos nas dietas e as concentrações nos tecidos dos camarões

Os triglicerídeos contêm ácidos graxos como unidades fundamentais, caracterizando-se como os lipídios mais simples e abundantes das células de plantas e animais (Lehninger 1986). Em camarões, os triglicerídeos desempenham funções reprodutivas, participando, por exemplo, da síntese de células espermáticas nos testículos (Mourente & Rodríguez 1997). Além de desempenharem função energética, pois esses são o componente bioquímico mais importante para estocagem de energia por meio do armazenamento de gordura alimentar (Palacios *et al.* 1999). Por isso, os triglicerídeos têm sido utilizados como indicadores nutricionais de camarões peneídeos (Mercier *et al.* 2006). No entanto, também foram iguais entre os tratamentos.

A glicose é o carboidrato mais abundante na hemolinfa em crustáceos (Gutiérrez *et al.* 2007), representando a principal fonte energética para o funcionamento de órgãos e músculos (Hall & van Ham 1998). Os níveis de glicose podem ser influenciados por fatores como estágio de muda, temperatura, manejo, condição nutricional e outros (Hollmann *et al.* 2008).

A concentração de glicose presente nos tecidos de reserva é parâmetro para indicar estresse em crustáceos (Mercier *et al.* 2006). Os valores de glicose na hemolinfa entre 13-20 mg.dl⁻¹ geralmente ocorrem em animais sem estresse (Racotta & Palacios 1998, Racotta *et al.* 2002, Pascual *et al.* 2003b). A hiperglicemia é a resposta bioquímica típica de muitos animais marinhos ao estresse (Hollmann *et al.* 2008). Essa elevação na concentração de glicose é induzida pelo Hormônio Hiperglicêmico de Crustáceos (CHH, sigla em inglês) (Gutiérrez *et al.* 2007). Esse hormônio é secretado pelo complexo órgão X – glândula do seio (Fingerman 1997) após a exposição do animal a eventos estressantes como, por exemplo, manipulação, emersão, variação brusca de salinidade, doenças, exposição a poluentes e elevadas temperaturas (Lorenzon *et al.* 2008).

O CHH é responsável pela mobilização da glicose, a partir da hidrólise do glicogênio armazenado nos músculos e no hepatopâncreas. Quando os níveis de glicose na hemolinfa estão baixos, o CHH é secretado, promovendo a hidrólise do glicogênio e, por conseguinte, elevando a concentração de glicose. Em contrapartida, quando os níveis de glicose estão elevados na hemolinfa, a liberação do CHH é inibida. Nessa etapa, o processo de produção da glicose é então paralisado (Hollmann *et al.* 2008).

No presente estudo, dentre os componentes bioquímicos dos tecidos, apenas as concentrações da glicose na hemolinfa e no hepatopâncreas apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. Na hemolinfa, a glicose foi maior no tratamento ração (31,19±14,40mg.dl⁻¹) do que nos tratamentos alimento fresco (12,24±5,18mg.dl⁻¹) e alimento fresco mais ração (10,97±3,76mg.dl⁻¹). No hepatopâncreas, a glicose foi diferente apenas entre os tratamentos alimento fresco (2,26±1,51mg.dl⁻¹) e ração (4,68±1,52mg.dl⁻¹).

A concentração média de glicose na hemolinfa dos camarões alimentados apenas com ração (31,19mg.dl⁻¹) caracterizou animais estressados e hiperglicêmicos. Esse estresse provavelmente foi causado pela deficiência nutricional. Isto porque nos demais tratamentos não foi verificada hiperglicemia.

Em suma, os camarões alimentados apenas com ração apresentaram hiperglicemia, demonstrada pelas maiores concentrações de glicose na hemolinfa; hepatopâncreas mais pesados; e maiores taxas de ausência de espermatóforo e de melanização.

Os parâmetros de qualidade de água podem ser responsáveis por problemas fisiológicos e/ou perda de qualidade reprodutiva (Cavalli *et al.* 1998, Pascual *et al.* 1998, Pascual *et al.* 2003a, Perez-Velazquez *et al.* 2001). No entanto, os parâmetros de qualidade de água para todos os tratamentos estavam dentro do considerado ideal para a espécie (Marchiori & Boff 1983, Peixoto *et al.* 2005), com temperaturas entre 24,5°C a 29°C e salinidade de 33 a 35. Desse modo, a deficiência nutricional provavelmente foi o principal fator para explicar os resultados do presente trabalho.

A ração aparentemente não supriu as exigências nutricionais dos machos reprodutores, gerando estresse fisiológico, verificado pela elevada concentração da glicose na hemolinfa. A reconstituição das reservas energéticas como mecanismo de manutenção do metabolismo do animal foi priorizada, demonstrada pela maior concentração de glicose no hepatopâncreas e, conseqüente aumento do peso do mesmo. Por fim, os processos de maturação e reprodução foram em parte prejudicados, tendo em vista as maiores taxas de melanização e ausência de espermatóforo. Diante desse quadro de estresse, a sobrevivência foi menor nesse tratamento.

CONCLUSÕES

Há evidências de que a condição de estresse observada nos camarões do tratamento ração foi resultante do fator nutricional. A inclusão de itens frescos e diversificados em sistemas de maturação de *F. paulensis*, visando à maturação de machos, é importante para evitar o estresse, baixas sobrevivências, altas taxas de melanização e de ausência de espermatóforo. Dietas misturando alimento fresco e ração podem ser utilizadas sem causar prejuízos reprodutivos em machos. Conforme tem sido observado em trabalhos anteriores com outras espécies de peneídeos, o emprego exclusivo de ração na manutenção de reprodutores machos de *F. paulensis* demonstrou ineficiência do atendimento das exigências nutricionais desses animais em cativeiro. Não sendo indicado, portanto, o uso de apenas ração no sistema de maturação para machos do camarão-rosa.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos na presente dissertação foi possível caracterizar ultraestruturalmente o espermatozóide do camarão-rosa. O espermatozóide do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante 1967) é do tipo uniestrelado, constituído por um corpo principal e um único espinho derivado do acrossoma. As medidas morfométricas do espermatozóide e as membranas lamelares citoplasmáticas pouco visíveis são as principais características ultraestruturais que diferenciam o espermatozóide de *F. paulensis* dos espermatozóides das demais espécies de camarões peneídeos já estudadas.

Além disso, na presente dissertação foi avaliado o efeito de três tipos de dietas sobre a qualidade espermática e da composição bioquímica dos tecidos. Os resultados obtidos indicam que as dietas formuladas apenas com ração não atendem as exigências nutricionais dos machos. Assim, a inclusão de itens frescos é fundamental para o êxito da maturação e produção de espermatóforos e espermatozóides de boa qualidade.

De maneira geral, os resultados obtidos podem contribuir para futuros estudos filogenéticos e para o desenvolvimento de estratégias reprodutivas a serem tomadas em sistemas de maturação do camarão-rosa. No entanto, outros aspectos morfológicos do trato reprodutivo e das células espermáticas, além de aspectos nutricionais e fatores que afetam o desempenho reprodutivo dos machos de *F. paulensis* ainda devem ser investigados.

Para melhor compreender a ultraestrutura dos espermatozóides encontrados nos espermatóforos do camarão-rosa, a espermiogênese da espécie ainda deve ser estudada, para verificar as modificações e os processos envolvidos na maturação das células. Assim como, as alterações morfológicas que os espermatozóides sofrem após a

transferência dos espermatóforos para o tólico das fêmeas, a reação acrossômica dos espermatozoides e a interação espermatozoide-ovócito.

Quanto aos aspectos nutricionais, ainda precisam ser investigadas as exigências de nutrientes específicos, como ácidos graxos altamente insaturados e poliinsaturados. Outros fatores como temperatura, tempo de regeneração dos espermatóforos, aclimação e outros também devem ser investigados. Esses aspectos nutricionais e fatores contribuirão para o melhoramento do desempenho reprodutivo dos machos de *F. paulensis* em cativeiro.

LITERATURA CITADA

- ABE, MP, CN FRÓES, C PRENTICE-HERNÁNDEZ, W WASIELESKY & RO CAVALLI. 2008. Substituição da farinha de peixe por farelo de soja em dietas práticas para o camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*). *Cienc. Rural*, 38(1): 219-224.
- ABREU, PC, ELC BALLESTER, C ODEBRECHT, W WASIELESKY, RO CAVALLI, W GRANÉLI & AM ANESIO. 2007. Importance of biofilm as food source for shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*) evaluated by stable isotopes ($\delta_{13}\text{C}$ and $\delta_{15}\text{N}$). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 347: 88-96.
- ALFARO, JM. 1993. Reproductive quality evaluation of male *Penaeus stylirostris* from a grow-out pond. *J. World Aquacult. Soc.*, 24(1): 6-11.
- ALFARO, JM. 2001. Controlled reproduction of penaeid shrimp: a contribution to its improvement. Doctoral dissertation, Wageningen University, The Netherlands, 149p.
- ALFARO, JM, AL LAWRENCE & D LEWIS. 1993. Interaction of bacteria and Male Reproductive System Blackening Disease of captive *Penaeus setiferus*. *Aquaculture*, 117: 1-8.
- ALFARO, JM, K ULATE & M VARGAS. 2007. Sperm maturation and capacitation in the open thelycum shrimp *Litopenaeus* (Crustacea: Decapoda: Penaeoidea). *Aquaculture*, 270: 436-442.
- ALFARO, JM, N MUÑOZ, M VARGAS & J KOMEN. 2003. Induction of sperm activation in open and closed thelycum penaeoid shrimps. *Aquaculture*, 216: 371-381.
- ALFARO, JM & X LOZANO. 1993. Development and deterioration of spermatophores in pond-reared *Penaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.*, 24(4): 522-529.
- ALMEIDA, HLPS & F D'INCAO. 1999. Análise do esforço de pesca do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) na Lagoa dos Patos, Brasil. *Atlântica*, 21: 77-92.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2000. Official methods of analysis of AOAC. CUNNIF, P. (ed.). Washington, USA.
- ARCOS, GF, AM IBARRA, C VAZQUEZ-BOUCARD, E PALACIOS & IS RACOTTA. 2003a. Haemolymph metabolic variables in relation to eyestalk

- ablation and gonad development of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. *Aquac. Res.*, 34: 749-755.
- ARCOS, FG, AM IBARRA, E PALACIOS, C VAZQUEZ-BOUCARD & IS RACOTTA. 2003b. Feasible predictive criteria for reproductive performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*: egg quality and female physiological condition. *Aquaculture*, 228: 335-349.
- BALLESTER, ELC, W WASIELESKY, RO CAVALLI, MHS SANTOS & PC ABREU. 2003. Influência do biofilme no crescimento do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* em sistemas de berçário. *Atlântica*, 25(2): 117-122.
- BALLESTER, ELC, W WASIELESKY, RO CAVALLI & PC ABREU. 2007. Nursery of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* in cages with artificial substrates: biofilm composition and shrimp performance. *Aquaculture*, 269: 355-362.
- BARBIERI-JÚNIOR, RC & AO NETO. 2001. Camarões marinhos: reprodução, maturação e larvicultura. Viçosa, Aprenda Fácil. 254p.
- BAUER, RT. 1991. Sperm transfer and storage structures in penaeoid shrimp: a functional and phylogenetic perspective. In: BAUER, RT & JW MARTIN (eds.). *Crustacean Sexual Biology*. Columbia University Press, USA, Chap 11: 183-207.
- BAUER, RT & CE CASH. 1991. Spermatophore structure and anatomy of the ejaculatory duct in *Penaeus setiferus*, *P. duorarum* and *P. aztecus* (Crustacea: Decapoda): homologies and functional significance. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 110(2): 144-162.
- BAUER, RT & LJ MIN. 1993. Spermatophores and plug substance of the marine shrimp *Trachypenaeus similis* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae): formation in the male reproductive tract and disposition in the inseminated female. *Biol. Bull.*, 185: 174-185.
- BOFF, MH & MA MARCHIORI. 1984. The effect of temperature on larval development on the pink shrimp *Penaeus paulensis*. *Atlântica*, 7: 7-13.
- BRAY, WA & AL LAWRENCE. 1992. Reproduction of *Penaeus* species in captivity. In: FAST, A & LJ LESTER (eds.). *Marine shrimp culture: principles and practices*. Elsevier Science Publishers B.V., The Netherlands, Chap. 5: 93-169.

- BROWDY, CL. 1992. A review of the reproductive biology of *Penaeus* species: perspectives on controlled shrimp maturation systems for high quality nauplii production. In: WYBAN, J (ed.). Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. Baton Rouge: World Aquaculture Society, USA, Chap. 29: 22-51.
- BROWDY, CL. 1998. Recent developments in penaeid broodstock and seed production technologies: improving the outlook for superior captive stocks. *Aquaculture*, 164: 3-21.
- CAHU, CL, G CUZON & P QUAZUGUEL. 1995. Effect of highly unsaturated fatty acids, α -tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 112A(3/4): 417-424.
- CAVALLI, RO, MP SCARDUA & W WASIELESKY. 1997. Reproductive performance of different-sized wild and pond-reared *Penaeus paulensis* females. *J. World Aquacult. Soc.*, 28(3): 260-267.
- CAVALLI, RO, SM PEIXOTO & W WASIELESKY. 1998. Performance of *Penaeus paulensis* (Pérez-Farfante) broodstock under long-term exposure to ammonia. *Aquac. Res.*, 29: 815-822.
- CEBALLOS-VÁZQUEZ, BP, B APARICIO-SIMÓN, E PALACIOS & IS RACOTTA. 2004. Sperm quality over consecutive spermatophore regeneration in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.*, 35(2): 178-188.
- CEBALLOS-VÁZQUEZ, BP, C ROSAS & IS RACOTTA. 2003. Sperm quality in relation to age and weight of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 228: 141– 151.
- CEDEÑO, R, E VALENZUELA & J RODRÍGUEZ. 2000. Efectores inmunitarios como marcadores de deficiencias nutricionales em dietas para *Litopenaeus vannamei*. *Panorama Acuicola*, 5: 42-44.
- CLARK, WH & FJ GRIFFIN. 1988. The morphology and physiology of the acrosome reaction in the sperm of the Decapod, *Sicyonia ingentis*. *Develop. Growth Differ.*, 30(5): 451-462.
- CLARK, WH, JW LYNN, AI YUDIN & HO PERSYN. 1980. Morphology of the cortical reaction in the eggs of *Penaeus aztecus*. *Biol. Bull.*, 158: 175-186.

- COMAN, GJ, SJ ARNOLD, MJ JONES & NP PRESTON. 2007a. Effect of rearing density on growth, survival and reproductive performance of domesticated *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 264: 175–183.
- COMAN, GJ, SJ ARNOLD, TR CALLAGHAN & NP PRESTON. 2007b. Effect of two maturation diet combinations on reproductive performance of domesticated *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 263: 75-83.
- COSTA, SW. 1992. Aspectos da biologia da reprodução de machos do “camarão-rosa” *Penaeus (Farfantepenaeus) paulensis* Pérez-Farfante 1967 (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) para o manejo de reprodutores em aquicultura. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 103p.
- CUARTAS, EI & LG SOUSA. 2007. Ultrastructural study of the spermatophores and spermatozoa in *Uca uruguayensis* (Decapoda, Brachyura, Ocypodidae). *Biociências*, 15(1): 21-28.
- DALL, W, BJ HILL, OC ROTH LISBERG & DJ STAPLES. 1990. The biology of the Penaeidae. In: BLAXTER, JHS & AJ SOUTHWARD (eds.). *Advances in Marine Biology*. Academic Press, UK, volume 27, 489p.
- DESANTIS, S, M LABATE, GM LABATE, P MAIORANO & A TURSI. 2006. Na ultrastructural and histochemical study of the germinal cells contained in hemispermatozoa of males of the *Aristaeomorpha foliacea* (Risso 1827). *Hydrobiologia*, 557: 41-49.
- DÍAZ, AC, AVF GIMENEZ, NS HARÁN & JL FENUCCI. 2001. Reproductive performance of male argentine red shrimp *Pleoticus muelleri* Bate (Decapoda, Penaeoidea) in culture conditions. *J. World Aquac. Soc.*, 32: 236–242.
- DÍAZ, AC & J FENUCCI. 2004. Effect of prepared diet on the induction of precocious maturation in *Pleoticus muelleri* Bate (Crustacea, Penaeoidea). *Aquac. Res.*, 35: 1166-1171.
- D'INCAO, F. 1991. Pesca e biologia de *Penaeus paulensis* na Lagoa dos Patos. *Atlântica*, 13(1): 159-169.
- D'INCAO, F, H VALENTINI & LF RODRIGUES. 2002. Avaliação da pesca de camarões nas regiões sudeste e sul do Brasil, 1965-1999. *Atlântica*, 24(2): 103-116.

- DU, S, C HU, S CAI, Q SHEN & S ZHENG. 2006. Effect of different levels of dietary α -tocopherol on ovarian maturation and reproductive performance of broodstock *Litopenaeus vannamei* (Boone). *J. Shellfish Res.*, 25(2): 589-593.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2009. World review of fisheries and aquaculture – fisheries resources: trends in production, utilization and trade. 84p.
- FELGENHAUER, BE & LG ABELE. 1991. Morphological diversity of decapod spermatozoa. In: BAUER, RT & JW MARTIN (eds.). *Crustacean Sexual Biology*. Columbia University Press, USA. Chap. 18: 322–341.
- FERNANDES, EHL, I MARINÕ-TAPIA, KR DYER & OO MÖLLER. 2004. The attenuation of tidal and subtidal oscillations in the Patos Lagoon estuary. *Ocean Dyn.*, 54: 348-359.
- FINGERMAN, M. 1997. Crustacean endocrinology: a retrospective, prospective and analysis. *Physiol. Zool.*, 70: 257-269.
- FRANSOZO, VN. 2008. Morfologia dos caracteres sexuais secundários e caracterização gonadal masculina em *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Crustacea, Dendrobranchiata, Penaeoidea). Dissertação mestrado, Universidade Estadual Paulista, Brasil. 73p.
- FRÓES, CN, MP ABE, W WASIELESKY, C PRENTICE-HERNÁNDEZ & RO CAVALLI. 2007. Efeitos de dietas práticas com diferentes níveis de proteína bruta na sobrevivência e crescimento do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante 1967). *Atlântica*, 29(1): 25-34.
- GOIMIER, Y, C PASCUAL, A SÁNCHEZ, G GAXIOLA, A SÁNCHEZ & C ROSAS. 2006. Relation between reproductive, physiological, and immunological condition of *Litopenaeus setiferus* pre-adult males fed different dietary protein levels (Crustacea; Penaeidae). *Anim. Reprod. Sci.*, 92: 193–208.
- GUINOT, D, BGM JAMIESON & BR FORGES. 1994. Relationship of Homolidae and Dromiidae: evidence from spermatozoal ultrastructure (Crustacea, Decapoda). *Acta Zool.*, 75(3): 255-267.
- GUTIÉRREZ, A, J NIETO, F POZO, S STERN & L SCHOOFS. 2007. Effect of insulin/IGF-I like peptides on glucose metabolism in the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 153: 170-175.

- GWO, JC. 2000. Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review. *Aquac. Res.*, 31: 259-271.
- HALL, MR & EH van HAM. 1998. The effects of different types of estress on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. World. Aquacult. Soc.*, 29: 290-299.
- HARRISON, K. 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans. A review. *J. Shellfish Res.*, 9: 1–28.
- HARRISON, K. 1997. Broodstock nutrition and maturation diets. In: D'ABRAMO, LR, DE CONKLIN & DM AKIYAMA (eds.). Crustacean nutrition. Advances in World Aquaculture. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, USA, Chap 14: 390-408.
- HAYAT, MA. 1978. Introduction to biological scanning electron microscopy. Baltimore, University Park Press. 323p.
- HEITZMANN, JC, A DITER & AQUACOP. 1993. Spermatophore formation in the white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone 1931: dependence on the intermoult cycle. *Aquaculture*, 116: 91-98.
- HENNING, OL & ER ANDREATTA. 1998. Effect of temperature in an intensive nursery system for *Penaeus paulensis* (Pérez Farfante, 1967). *Aquaculture*, 164: 167-172.
- HINSCH, GW. 1991. Structure and chemical content of the spermatophores and seminal fluid of reptantian decapods. In: BAUER, RT & JW MARTIN (eds.). Crustacean Sexual Biology. Columbia University Press, USA. Chap.16: 290-307.
- HOLLMANN, G, RO CAVALLI, GS TRINDADE & PE MARTÍNEZ. 2008. Avaliação do efeito da radiação ultravioleta “A” sobre porcentagens de fagocitose em hemócitos e concentração da glicose na hemolinfa do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. *Atlântica*, 30(2): 107-112.
- HUANG, J, S JIANG, H LIN, F ZHOU & L YE. 2008. Effects of dietary highly unsaturated fatty acids and astaxanthin on the fecundity and lipid content of pond-reared *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. *Aquac. Res.*, 39: 240-251.

- KANG, X, S GE, M GUO, G LIU & S MU. 2008. A transmission electron microscopy investigation: the membrane complex in spermatogenesis of *Fenneropenaeus chinensis*. *Cytotechnology*, 56: 113-121.
- KIM, DH, Q JO, JH CHOI, SJ YUN, TY OH, BK KIM & C HAN. 2003. Sperm structure of the pandalid shrimp *Pandalopsis japonica* (Decapoda, Pandalidae). *J. Crust. Biol.*, 23(1): 23-32.
- KLEVE, MG, AL YUDIN & WH CLARK. 1980. Fine structure of the unistellate sperm of the shrimp, *Sicyonia ingentis* (Natantia). *Tissue Cell*, 12: 29-45.
- KROL, RM, WE HAWKINS & RM OVERSTREET. 1992. Reproductive components. In: HARRISON, FW & AG HUMES (eds.). *Microscopic anatomy of invertebrates: Decapod Crustacean*. Wiley-Liss Inc., USA, Chap 10: 295–343.
- KRUEVAISAYAWAN, H, R VANICHVIRIYAKIT, W WEERACHATYANUKUL, S IAMSAARD, B WITHYACHUMNARNKUL, A BASAK, N TANPHAICHITR & P SOBHON. 2008. Induction of the acrosome reaction in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, requires sperm trypsin-like enzyme activity. *Biol. Reprod.*, 79(1): 134-141.
- KRUMMENAUER, D, W WASIELESKY, RO CAVALLI, S PEIXOTO & PR ZOGBI. 2006. Viabilidade do cultivo do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Crustácea, Decapoda) em gaiola sob diferentes densidades durante o outono no sul do Brasil. *Cienc. Rural*, 36(1): 252-257.
- KULKARNI, GK & R NAGABHUSHANAM. 1979. Mobilization of organic reserves during ovarian development in the marine prawn, *Parapenaeopsis hardwickii* (Miers) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Aquaculture*, 18: 373-377.
- LEHNINGER, AL. 1986. *Princípios de bioquímica*. São Paulo, Savier. 725p.
- LEUNG-TRUJILLO, JR & AL LAWRENCE. 1987a. Observations on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions. *Aquaculture*, 65: 363– 370.
- LEUNG-TRUJILLO, JR & AL LAWRENCE. 1987b. Spermatophore generation times in *Penaeus setiferus*, *P. vannamei*, and *P. stylirostris*. *J. World Aquac. Soc.*, 22(4): 244-251.

- LORENZON, S, PG GIULIANINI, S LIBRALATO, M MARTINIS & EA FERRERO. 2008. Stress effect of two different transport systems on the physiological profiles of the crab *Cancer pagurus*. *Aquaculture*, 278: 156-163.
- LYNN, JW & WH CLARK. 1983. The fine structure of the mature sperm of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biol. Bull.*, 164: 459-470.
- MAGGIONI, DS, ER ANDREATA, EM HERMES & MA BARRACCO. 2004. Evaluation of some hemato-immunological parameters in female shrimp *Litopenaeus vannamei* submitted to unilateral eyestalk ablation in association with a diet supplemented with superdoses of ascorbic acid as a form of immunostimulation. *Aquaculture*, 241: 501-515.
- MALEK, SRA & FM BAWAB. 1974. The formation of the spermatophore in *Penaeus kerathurus* (Forskal 1775) (Decapoda, Penaeidae). I. The initial formation of a sperm mass. *Crustaceana*, 26(3): 273-285.
- MALPARTIDA, J & L VINATEA. 2007. Monitoramento do crescimento de juvenis de *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante 1967) com vistas a um futuro repovoamento da Lagoa de Ibiraquera, Imbituba, SC. *Biotemas*, 20(3): 37-45.
- MARCHIORI, MA & MH BOFF. 1983. Induced maturation, spawning and larvae culture of the pink shrimp *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. *Mem. Asoc. Latinoam. Acuicult.*, 5: 331-337.
- MARSDEN, GE, JJ MCGUREN, SW HANSFORD & MJ BURKE. 1997. A moist artificial diet for prawn broodstock: its effect on the variable reproductive performance of wild caught *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 149: 145-156.
- MARTINS, TG, RO CAVALLI, RC MARTINO, CEM REZENDE & W WASIELESKY JR. 2006. Larviculture output and stress tolerance of *Farfantepenaeus paulensis* postlarvae fed *Artemia* containing different fatty acids. *Aquaculture*, 252: 525-533.
- MEDINA, A. 1994. Spermiogenesis and sperm structure in the shrimp *Parapenaeus longirostris* (Crustacea: Dendrobranchiata): comparative aspects among decapods. *Mar. Biol.*, 119: 449-460.
- MEDINA, A, E GARCÍA-ISARCH, I SOBRINHO & FJ ABASCAL. 2006. Ultrastructure of the spermatozoa of *Aristaeopsis edwardsiana* and *Aristeus*

- varidens* (Crustacea, Dendrobranchiata, Aristeidae). *Zoomorphology*, 125: 39-46.
- MEDINA, A, G MOURENTE, L ROSA, A SANTOS & A RODRIGUEZ. 1994a. Spermatozoal ultrastructure of *Penaeus kerathurus* and *Penaeus japonicus* (Crustacea, Dendrobranchiata). *Zoomorphology*, 114:161-167.
- MEDINA, A, IL LA ROSA & A SANTOS. 1994b. Ultrastructural comparison of the spermatozoa of *Sicyonia carinata* (Sicyoniidae) and *Penaeopsis serrata* (Penaeidae) shrimp (Crustacea, Dendrobranchiata), with particular emphasis on the acrosomal structure. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 26(3): 395-403.
- MERCIER, L, E PALACIOS, AI CAMPA-CÓRDOVA, D TOVAR-RAMÍREZ, R HERNÁNDEZ-HERRERA & IS RACOTTA. 2006. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. *Aquaculture*, 258: 633-640.
- MEUNPOL, O, P MEEJING & S PIYATIRATITIVORAKUL. 2005. Maturation diet based on fatty acid content for male *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. *Aquac. Res.*, 36: 1216-1225.
- MISAMORE, MJ & CL BROWDY. 1996. Mating behavior in the white shrimps *Penaeus setiferus* and *P. vannamei*: a generalized model for mating in *Penaeus*. *J. Crustacean Biol.*, 16(1): 61-70.
- MÖLLER, OO, JA LORENZETTI, JL STECH & MM MATA. 1996. The Patos Lagoon summertime circulation and dynamics. *Cont. Shelf. Res.*, 16(3): 335-351.
- MÖLLER, OO, P CASTAING, J SALOMON & P LAZURE. 2001. The influence of local and non-local forcing effects on the subtidal circulation of Patos Lagoon. *Estuaries*, 24(2): 275-289.
- MOURENTE, G & A RODRÍGUEZ. 1997. Effects of salinity and dietary DHA (22:6n-3) content on lipid composition and performance of *Penaeus kerathurus* postlarvae. *Mar. Biol.*, 128: 289-298.
- NAESSENS, E, P LAVENS, L GOMEZ, CL BROWDY, K McGOVERN-HOPINKS, AW SPENCER, D KAWAHIGASHI & P SORGELOOS. 1997. Maturation performance of *Penaeus vannamei* co-fed *Artemia* biomass preparations. *Aquaculture*, 155: 87-101.

- NAKAYAMA, CL, S PEIXOTO, A BIANCHINI, RB ROBALDO & RO CAVALLI. 2008a. Performance of *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante, 1967) broodstock in tanks with sand and hard substrate. *Aquac. Res.*, 39: 398-405.
- NAKAYAMA, C, S PEIXOTO, D LOPES, G VITA, D KRUMMENAUER, G FOES, RO CAVALLI & W WASIELESKY. 2008b. Métodos de extrusão manual e elétrica dos espermatóforos de reprodutores selvagens do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda: Penaeidae). *Cienc. Rural*, 38(7): 2018-2022.
- PALACIOS, E, AM IBARRA & IS RACOTTA. 2000. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture*, 185: 353-371.
- PALACIOS, E, CI PEREZ-ROSTRO, JL RAMIREZ, AM IBARRA & IS RACOTTA. 1999. Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival and growth. *Aquaculture*, 171: 309-321.
- PAPA, LP. 2007. Caracterização estrutural do sistema reprodutor masculino e do hepatopâncreas dos diferentes morfotipos de *Macrobrachium amazonicum*. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Paulista, Brasil. 94p.
- PARNES, S, S RAVIV, A SHECHTER & A SAGI. 2006. Males also have their time of the month! Cyclic disposal of old spermatophores, timed by the molt cycle, in a marine shrimp. *J. Exp. Biol.*, 209: 4974-4983.
- PASCUAL, C, A SÁNCHEZ, A SÁNCHEZ, F VARGAS-ALBORES, G LeMOULLAC & C ROSAS. 2003a. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture*, 218: 637-650.
- PASCUAL, C, E VALERA, C RE-REGIS, G GAXIOLA, A SANCHEZ, L RAMOS, LA SOTO & C ROSAS. 1998. Effect of temperature on reproductive tract condition of *Penaeus setiferus* adult males. *J. World Aquacult. Soc.*, 29: 477-484.
- PASCUAL, C, G GAXIOLA & C ROSAS. 2003b. Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. *Mar. Biol.*, 142: 735-745.

- PEIXOTO, S, RO CAVALLI, D KRUMMENAUER, W WASIELESKY & F D'INCAO. 2004a. Influence of artificial insemination on the reproductive performance of *Farfantepenaeus paulensis* in conventional and unisex maturation systems. *Aquaculture*, 230: 197–204.
- PEIXOTO, S, RO CAVALLI, F D'INCAO, AM MILACH & W WASIELESKY. 2003. Ovarian maturation of wild *Farfantepenaeus paulensis* in relation to histological and visual changes. *Aquac. Res.*, 34: 1255-1260.
- PEIXOTO, S, RO CAVALLI & W WASIELESKY. 2005. Recent developments on broodstock maturation and reproduction of *Farfantepenaeus paulensis*. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 48(6): 997-1006.
- PEIXOTO, S, RO CAVALLI, W WASIELESKY, F D'INCAO, D KRUMMENAUER & AM MILACH. 2004b. Effects of age and size on reproductive performance of captive *Farfantepenaeus paulensis* broodstock. *Aquaculture*, 238: 173–182.
- PERAZZOLO, LM, DM LORENZINI, S DAFFRE & MA BARRACCO. 2005. Purification and partial characterization of the plasma clotting protein from the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 142(B): 302-307.
- PERAZZOLO, LM & MA BARRACCO. 1997. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. *Dev. Comp. Immunol.*, 21(5): 385-395.
- PERAZZOLO, LM, R GARGIONI, P OGLIARI & MA BARRACCO. 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture*, 214: 19-33.
- PÉREZ-FARFANTE, I. 1975. Spermatophores and thelyca of the american white shrimp, genus *Penaeus*, subgenus *Litopenaeus*. *Fish. Bull.*, 73: 463-486.
- PÉREZ-FARFANTE, I & B KENSLEY. 1997. Penaeoid and Sergestoid shrimp and prawns of the world: keys and diagnosis for the families and genera. *Mem. Mus. Natl. Hist. Nat.*, 175: 1-233.
- PÉREZ-JAR, L. 2005. Fisiología y calidad reproductiva de machos de camarón blanco *Litopenaeus schmitti* em condiciones de cautiverio. Tesis de doctorado, Centro de Investigaciones Biológicas Del Noroeste, México, 132p.

- PEREZ-VELAZQUEZ, M, AL LAWRENCE, DM GATLIN, ML GONZÁLEZ-FÉLIX & WA BRAY. 2002. Replacement of fresh dietary components by a dry feed for successful maturation of male *Litopenaeus vannamei* (Boone) broodstock. *Aquac. Res.*, 33: 1901-1905.
- PEREZ-VELAZQUEZ, M, ML GONZÁLEZ-FÉLIX, AL LAWRENCE, WA BRAY & DM GATLIN. 2003. Dietary effects on sperm quality of *Litopenaeus vannamei* broodstock. *J. World Aquacult. Soc.*, 34: 92-98.
- PEREZ-VELAZQUEZ, M, WA BRAY, AL LAWRENCE, DM GATLIN & ML GONZÁLEZ-FÉLIX. 2001. Effect of temperature on sperm quality of captive *Litopenaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture*, 198: 209–218.
- PETERSEN, RL, E BELTRAME & R DERNER. 1996. Inseminacion artificial en *Penaeus paulensis* (Pérez-Farfante, 1967). *Rev. Investig. Mar.*, 17: 215-219.
- PONGTIPPATEE, P, R VANICHVIRIYAKIT, J CHAVADEJ, P PLODPAI, B PRATOOMCHART, P SOBHON & B WITHYACHUMNARNKUL. 2007. Acrosome reaction in the sperm of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda, Penaeidae). *Aquac. Res.*, 38: 1635-1644.
- PONTES, CS & ER ANDREATTA. 2003. Efeito da oferta de náuplios de *Artemia franciscana* enriquecidos com ácidos graxos poliinsaturados sobre o desenvolvimento de pós-larvas do camarão marinho *Farfantepenaeus paulensis*. *R. Bras. Zootec.*, 32(6): 1544-1550.
- RACOTTA, IS & E PALACIOS. 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *J. World. Aquacult. Soc.*, 29: 351-356.
- RACOTTA, IS, E PALACIOS & AM IBARRA. 2003. Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. *Aquaculture*, 227: 107-130.
- RACOTTA, IS, E PALACIOS & L MÉNDEZ. 2002. Metabolic responses to short and long-term exposure to hypoxia in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Mar. Fresh. Behav. Physiol.*, 35: 269-275.
- ROBINSON, DG, U EHLERS, R HERKEN, B HERRMANN, F MAYER & FW SCCHÜRMANN. 1987. Methods of preparation for electron microscopy. New York, Springer-Verlag. 190p.

- ROTHLISBERG, PC. 1998. Aspects of penaeid biology and ecology of relevance to aquaculture: a review. *Aquaculture*, 164: 49-65.
- RUPPERT, EE & RD BARNES. 2005. Zoologia dos Invertebrados. São Paulo, Rouca. 1168p.
- SAMUEL, MJ, T KANNUPANDI & P SOUNDARAPANDIAN. 1999. Nutritional effects on male reproductive performance in the freshwater prawn. *Aquaculture*, 172: 327-333.
- SÁNCHEZ, A, C PASCUAL, A SÁNCHEZ, F VARGAS-ALBORES, GL MOULLAC & C ROSAS. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture*, 198: 13-28.
- SARATHI, M, VPI AHMED, C VENKATESAN, G BALASUBRAMANIAN, J PRABAVATHY & ASS HAMEED. 2007. Comparative study on immune response of *Fenneropenaeus indicus* to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 271: 8-20.
- SCELZO, MA & A MEDINA. 2003. Spermatozoal ultrastructure in *Artemisia longinaria* (Decapoda, Penaeidae). *J. Crust. Biol.*, 23(4): 814-818.
- SCELZO, MA & A MEDINA. 2004. A dendrobranchiate, *Peisos petrunkevitchi* (Decapoda, Sergestidae), with reptant-like sperm: a spermiocladistic assessment. *Acta Zool.*, 85: 81-89.
- SHIGEKAWA, K & WH CLARK. 1986. Spermiogenesis in the Marine Shrimp, *Sicyonia ingentis*. *Develop. Growth Differ.*, 28(2): 95-112.
- SILVEIRA, M. 1989. Preparação de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: Souza, W (ed.). Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica. USP, Brasil, 71-79.
- SOARES, R, S PEIXOTO, C BEMVENUTI, W WASIELESKY, F D'INCAO, N MURCIA & S SUITA. 2004. Composition and abundance of invertebrate benthic fauna in *Farfantepenaeus paulensis* culture pens (Patos Lagoon estuary, Southern Brazil). *Aquaculture*, 239: 199-215.
- SOARES, R, S PEIXOTO, W WASIELESKY & FD D'INCAO. 2005a. Feeding rhythms and diet of *Farfantepenaeus paulensis* under pen culture in Patos Lagoon estuary, Brazil. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 322: 167-176.

- SOARES, R, S PEIXOTO, W WASIELESKY & FD D'INCAO. 2006. Effect of different food items on the survival and growth of *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante 1967) postlarvae. *Aquac. Res.*, 37: 1413-1418.
- SOARES, R, S PEIXOTO, W WASIELESKY & FD D'INCAO. 2008. Effects of feeding plant material on growth and survival of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Atlântica*, 30(1): 17-22.
- SOARES, R, W WASIELESKY, S PEIXOTO & F D'INCAO. 2005b. Food consumption and gastric emptying of *Farfantepenaeus paulensis*. *Aquaculture*, 250: 283-290.
- SUBRAMONIAM, T. 1991. Chemical composition of spermatophores in decapod crustaceans. In: BAUER, RT & JW MARTIN (eds.). *Crustacean Sexual Biology*. Columbia University Press, USA. Chap 17: 308-321.
- SURESHKUMAR, S & BM KURUP. 1999. Variations in hepatosomatic index and biochemical profiles among the mael morphotypes of *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 176: 285-293.
- TALBOT, P, D HOWARD, J LEUNG-TRUJILLO, TW LEE, W-Y LI, H RO & AL LAWRENCE. 1989. Characterization of Male Reproductive Tract Degenerative Syndrome in captive Penaeid shrimp (*Penaeus setiferus*). *Aquaculture*, 78: 365-377.
- THOMPSON, FL, PC ABREU & W WASIELESKY. 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture*, 203: 263-278.
- TSUZUKI, MY, RO CAVALLI & A BIANCHINI. 2003. Effect of salinity on survival, growth, and oxygen consumption of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez- Farfante, 1967). *J. Shellfish Res.*, 22(2): 555-559.
- VACA, AA & JM ALFARO. 2000. Ovarian maturation and spawning in the white shrimp, *Penaeus vannamei*, by serotonin injection. *Aquaculture*, 182: 373-385.
- VARGAS-ALBORES, F & G YEPIZ-PLASCENCIA. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture*, 191: 13-21.
- VAZQUEZ-BOUCARD, CG, J PATROIS & HJ CECCALDI. 2004. Exhaustion of lipids reserves in the hepatopancreas of *Fenneropenaeus indicus* broodstock in relation to successive spawnings. *Aquaculture*, 236: 523-537.

- VINATEA, L & ER ANDREATA. 1997. Comparative study of continuous and static water renewal strategies in the larviculture of *Penaeus paulensis* (Pérez-Farfante, 1967) associated with high stocking densities and different water renewal rates. *Aquaculture*, 154: 247-259.
- WANG, Q, M MISAMORE, CQ JIANG & CL BROWDY. 1995. Egg water induced reaction and biostain assay of sperm from marine shrimp *Penaeus vannamei*: dietary effects on sperm quality. *J. World Aquacult. Soc.*, 26(3): 261-271.
- WASIELESKY, W. 2000. Cultivo de juvenis do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda, Penaeidae) no estuário da Lagoa dos Patos: efeitos de parâmetros ambientais e manejo de cultivo. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande, Brasil. 199p.
- WASIELESKY, W, A BIANCHINI, CC SANCHEZ & LH POERSCH. 2003. The effect of temperature, salinity and nitrogen products on food consumption of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 46(1): 135-141.
- WONGPRASERT, K, S ASUVAPONGPATANA, P POLTANA, M TIENSUWAN & B WITHYACHUMNAMKUL. 2006. Serotonin stimulates ovarian maturation and spawning in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 261: 1447-1454.
- WOUTERS, R, B ZAMBRANO, M ESPIN, J CALDERON, P LAVENS & P SORGELOOS. 2002. Experimental broodstock diets as partial fresh food substitutes in white shrimp *Litopenaeus vannamei* B. *Aquac. Nutr.*, 8: 249-256.
- WOUTERS, R, P LAVENS, J NIETO & P SORGELOOS. 2001a. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. *Aquaculture*, 202: 1-21.
- WOUTERS, R, X PIGUAVE, L BASTIDAS, J CALDERON & P SORGELOOS. 2001b. Ovarian maturation and haemolymphatic vitellogenin concentration of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed increasing levels of total dietary lipids and HUFA. *Aquac. Res.*, 32: 573-582.
- XU, XL, WJ LI, JD CASTELL & RK O'DOR. 1994. Influence of dietary lipid sources on fecundity, egg hatchability and fatty acid composition of chinese prawn (*Penaeus chinensis*) broodstock. *Aquaculture*, 119: 359-370.

APÊNDICE 1

PREPARAÇÃO DO FIXADOR PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Metodologia de Robinson *et al.* (1987)

Para a obtenção da solução fixadora de amostras biológicas para microscopia eletrônica é imprescindível que o manejo de todas as soluções aqui apresentadas seja realizado com luva e em capela de exaustão. Essa solução é composta por 1:1:1 de glutaraldeído 6%, cacodilato de sódio 0,1M e paraformaldeído 6%. Para a sua preparação devem ser preparadas separadamente 40ml de cada um dos componentes da solução.

Para a preparação de 40ml de glutaraldeído a 6%, deve ser medido 9,6ml de glutaraldeído a 25% em uma proveta, cujo volume deve ser completado com água destilada. Por sua vez, para preparar 40ml de cacodilato de sódio a 0,1M, 0,8561g deve ser pesado e dissolvido em 40ml de água tridestilada em agitador magnético.

A preparação de 40ml de paraformaldeído a 6% é precedida pela preparação de paraformaldeído a 40%. Para tanto, 40g de paraformaldeído em pó devem ser pesados, sendo diluídos em 100ml de água tridestilada morna durante dois a três minutos sob agitação. Em seguida, em capela, a solução é aquecida a 60°C ou até 80°C durante 15 a 20 minutos. Por fim, deve ser adicionada uma ou duas gotas de hidróxido de sódio (NaOH) a 1N para o clareamento da solução. Uma vez, pronta a solução, 6ml de paraformaldeído a 40% deve ser medida em uma proveta de 100ml, cujo volume deve ser completado com água tridestilada, obtendo então paraformaldeído a 6%.

Finalmente, os 40ml de glutaraldeído a 6%, 40ml de cacodilato de sódio a 0,1M e 40ml de paraformaldeído a 6% devem ser misturados. A solução fixadora deve ser armazenada sob refrigeração (5°C).

APÊNDICE 2

SOLUÇÃO FISIOLÓGICA PARA *Farfantepenaeus paulensis*

Bianchini (com. pessoal)

A solução salina para a espécie deve ter pH de 7,4. A tabela abaixo lista os componentes químicos que compõem a solução e suas concentrações a serem utilizadas para a formulação da mesma:

COMPONENTES		g.l ⁻¹
Cloreto de sódio	NaCl	7,7
Cloreto de magnésio	MgCl ₂	1,65
Cloreto de cálcio	CaCl ₂	0,36
Cloreto de potássio	KCl	0,24
Bicarbonato de sódio	NaHCO ₃	0,07
Sulfato de sódio	Na ₂ SO ₄	1,30
Brometo de sódio	NaBr	0,02