



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE CÉLULAS  
ESPERMÁTICAS DE *Litopenaeus vannameii* SUBMETIDAS A  
CRIOPRESERVAÇÃO.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Orientador: Luis Alejandro Vinatea Arana

Coorientador: Felipe Vieira do Nascimento

Marcela Fornari Uberti

Florianópolis  
2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

- U14a Uberti, Marcela Fornari  
Avaliação da integridade de células espermáticas de  
*Litopenaeus vannamei* submetidas a criopreservação  
[dissertação] / Marcela Fornari Uberti ; orientador,  
Luis Alejandro Vinatea Arana. - Florianópolis, SC, 2012.  
53 p.: il., grafs., tabs.
- Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-  
Graduação em Aquicultura.
- Inclui referências
1. Aquicultura. 2. Baixas temperaturas - Pesquisa. 3.  
Sêmen. 4. Camarão marinho. 5. Sobrevivência celular. I.  
Vinatea Arana, Luis. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III.  
Título.

CDU 639.3

**Avaliação da integridade de células espermáticas de *Litopenaeus vannamei* submetidas a criopreservação**

Por

MARCELA FORNARI UBERTI

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

**MESTRE EM AQUICULTURA**

e aprovada em sua forma final pelo Programa de  
Pós-Graduação em Aqüicultura.

---

Prof. Evoy Zaniboni Filho, Dr.  
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

---

Dr. Luis Alejandro Vinatea Arana – *Orientador*

---

Dr. Evoy Zaniboni Filho

---

Dr. Hilton Amaral Júnior



**Dedico aos meus pais:**

**Mercedes Regina Fornari Uberti  
e  
Luiz Homero de Freitas Uberti**

Por todo Amor e Dedicção.



## **AGRADECIMENTOS**

---

Aos meus pais, por nunca medirem esforços ao me apoiarem nas minhas escolhas e decisões, por confiarem em mim, pelo carinho e amor. Ao meu irmão, pela amizade e companheirismo, sempre.

Ao meu orientador, Luis Vinatea, por me receber no LCM, me conceder essa oportunidade, e pelas ideias e dicas sempre bem vindas, bem humoradas e pertinentes. Até por ouvir algum desabafo.

Ao meu coorientador Felipe Vieira pela vontade de ver este trabalho dar certo, por me atender a qualquer hora, me tirar toda e qualquer dúvida, por me dar segurança e apoio, pela amizade.

A todo o pessoal do LCM pela amizade, conversas, e quebra galhos. Carlos, Rafa Arantes, Zé Luis, Walter, Katt, Leila, Patô, Déia, Dimas, estagiários da graduação. Ao Douglas, Helena e Geny, pela mão, sempre que precisei. Sozinha seria impossível. Aos queridos Davi e Ílson pela ajuda de sempre.

À Bibiana e ao Dênis, do LAMEB, pelas inúmeras (quase incontáveis) análises de citometria de fluxo. À Chirle e ao Demétrio, pelas microscopias.

À Prof. Mônica Tsuzuki, pelo empréstimo do botijão de nitrogênio.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Ao Carlito pela paciência e prestatividade.

Às minhas amigas queridas, de perto e de longe, que compreenderam minha ausência principalmente na etapa final deste trabalho.

**Meu muito obrigada!**





“A mente que se abre a uma nova idéia  
jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein.



## RESUMO

---

A fim de avaliar o potencial de criopreservação para células espermáticas de *Litopenaeus vannamei*, 74 espermatóforos foram extraídos manualmente de indivíduos sexualmente maduros. Após teste de toxicidade para definir concentração dos crioprotetores, suspensões de células espermáticas foram criopreservadas em grupos com solução de congelamento contendo crioprotetores distintos: dimetilsulfóxido (DMSO) e etilenoglicol (EG) ambos à concentração de 10%. Cada tratamento foi dividido em subgrupos para estocagem em nitrogênio líquido por diferentes períodos de tempo: 0, 30, 60 e 90 dias, em triplicata. Após o descongelamento em banho Maria a 25°C por cerca de 40 segundos, a integridade celular das suspensões foi analisada sob microscopia com coloração por eosina-nigrosina, e por citometria de fluxo. Não observou-se diferença significativa entre os crioprotetores utilizados. Para todos os tratamentos, as menores e as maiores mortalidades ocorreram em 0 e 90 dias, respectivamente. Através da técnica de coloração, a menor e a maior mortalidade foram, 23,17% e 82,11% com DMSO e 29,94% e 83,72% com EG. Com citometria de fluxo as mortalidades foram 2,42% e 55,13% com DMSO; e 0,90% e 55,56 % com EG. O coeficiente de correlação de Spearman indicou correlação positiva ( $R=0,91$ ) entre as duas técnicas utilizadas. Concluiu-se que houve queda considerável da integridade celular com o aumento do tempo de criopreservação.

Palavras-chave: criogenia, sêmen, camarão marinho, viabilidade celular.



## ABSTRACT

---

In order to assess the feasibility of long-term cryopreservation of sperm cells from *Litopenaeus vannamei*, 74 spermatophores were manually extracted from sexually mature individuals. After toxicity test to define the concentration of cryoprotectants to be used, suspensions of spermatophores were cryopreserved on groups with cryopreservation solutions containing distinct cryoprotectors: dimethylsulfoxide (DMSO) and ethylene glycol (EG), both at 10% concentration. For each treatment, spermatophores were divided into subgroups for storage in liquid nitrogen for different periods: 0, 30, 60 and 90 days, in triplicate. After thawing by putting cryovials on water at 25°C for 40 seconds, the suspensions were analyzed for cellular integrity under microscopy by staining with eosin-nigrosin, and by flow cytometry. No significant difference was detected between the cryoprotectants used. Through the staining technique, the lowest and highest mortality were, respectively from 0 and 90 days, 23,17% and 82,11% with DMSO and 29,94% and 83,72% with EG. With flow cytometry, the mortalities were 2,42% and 55,13% using DMSO; and 0,90% and 55,56% with EG at 0 and 90 days, respectively. Spearman correlation coefficient indicated a positive correlation ( $R = 0,91$ ) between the two techniques. It was concluded that the cell integrity declined considerable with the increased period of cryopreservation.

Keywords: Criogenics, sperm suspension, shrimp, cellular viability.



## SUMÁRIO

---

INTRODUÇÃO .....	17
Coleta de espermátóforos .....	19
Agentes crioprotetores.....	19
Velocidades de Congelamento e Descongelamento.....	22
Experimentos com camarões.....	23
Avaliação da integridade espermática após o descongelamento .....	24
JUSTIFICATIVA.....	26
OBJETIVOS .....	27
FORMATAÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....	27
AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE <i>Litopenaeus vannamei</i> SUBMETIDOS A TEMPO PROLONGADO DE CRIOPRESERVAÇÃO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO.....	28
RESUMO .....	29
ABSTRACT.....	30
INTRODUÇÃO .....	31
MATERIAIS E MÉTODOS .....	32
Material biológico .....	32
Manutenção dos reprodutores .....	32
Preparação dos gametas .....	32
Efeito dos agentes crioprotetores sobre a integridade celular .....	33
Desenho experimental.....	33
Preparação das amostras para criopreservação.....	34
Descongelamento .....	35
Avaliação da integridade espermática.....	35
Análises estatísticas.....	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS DO ARTIGO .....	42
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....	46
ANEXOS.....	51





## INTRODUÇÃO

---

As principais produções comerciais da carcinicultura no Brasil são da espécie *Litopenaeus vannamei*. Tal espécie foi introduzida há 14 anos no estado de Santa Catarina, e desde então é considerada como a mais bem adaptada às condições locais.

Desse modo tornam-se de grande importância investimentos em estudos de tecnologias que permitam explorar o potencial produtivo da espécie, bem como em biotecnologias de reprodução que facilitem a produção de pós-larvas da mesma.

As biotecnologias de reprodução têm como objetivo principal otimizar o aproveitamento dos gametas masculinos e femininos, e a produção de indivíduos de origem conhecida, priorizando as qualidades genéticas parentais. Biotécnicas que permitam estocagem de sêmen a longo prazo são importantes para a realização de diversos processos tais como hibridização, domesticação, conservação de populações e seleção genética, favorecendo assim programas de melhoramento genético em espécies de interesse econômico (CHAVES et al., 2010).

Nesse contexto, a criopreservação de sêmen aparece com uma alternativa interessante desde que observada sua factibilidade, os recursos disponíveis para adoção da técnica, bem como as limitações da mesma quanto ao período de armazenamento do material e grau de conservação possível de ser obtido durante o período desejado.

A importância da criopreservação de gametas torna-se cada vez maior em vários aspectos das pesquisas biológicas como a reprodução de animais domésticos e selvagens (WILDT et al., 1997) e até mesmo em práticas clínicas para casos de infertilidade em humanos (FRIEDLER et al., 1988). Leibo e Bradley (1999) apresentam uma revisão comparativa sobre os diversos aspectos da criopreservação e de como se aplicam especificamente para células germinativas de diversas espécies.

Na técnica de criopreservação, o uso de baixas temperaturas utilizando o nitrogênio líquido tem como princípio anular o metabolismo celular permitindo o armazenamento de material biológico, sem deterioração, teoricamente por tempo ilimitado, prolongando a vida útil dos espermatozoides, quando em condições ideais de estocagem (CARNEIRO, 2007). Ademais, o congelamento do sêmen em nitrogênio líquido garante estabilidade celular permitindo suprimento constante de sêmen com pouca mão-de-obra e espaço reduzido, sem as limitações sazonais de reprodução e menor custo na manutenção de

reprodutores ao diminuir o número de machos reprodutores da criação (GWO, 2000).

Existem inúmeros detalhes importantes que devem ser observados para o sucesso no armazenamento do sêmen por longos períodos, desde a sua incorporação à uma solução protetora adequada para eliminar as injúrias decorrentes do choque térmico e das velocidades de congelamento e descongelamento; seu correto resfriamento anteriormente ao congelamento, seu congelamento propriamente dito e finalmente seu descongelamento e utilização. Todos esses procedimentos variam amplamente em função da espécie (CARNEIRO, 2007).

Diversas etapas são necessárias para criopreservar gametas e embriões, e todas elas podem danificar ou destruir as células e tecidos. O fato de envolver diversos passos, torna o processo muito susceptível, pois um pequeno erro em qualquer uma das etapas pode acarretar na perda total da viabilidade do material biológico (TIERSCH; GREEN, 2011).

Leibo e Pool (2011) citam brevemente as etapas envolvidas na criopreservação de células animais: 1) coleta de células e tecidos, estimativa do número de células e viabilidade, 2) suspensão das células em solução com aditivos crioprotetores e transferência para criotubos 3) resfriamento da células até temperaturas negativas sob condições que garantam a desidratação quase total da célula, 4) estocagem das células em nitrogênio líquido para assegurar estabilidade a longo prazo, 5) aquecimento das amostras a temperaturas fisiológicas e 6) ensaios de função celular para determinar sobrevivência e normalidade das mesmas. Cada uma das etapas envolvidas na criopreservação deve ser considerada uma fonte de variabilidade na criopreservação celular, já que qualquer uma delas pode alterar ou danificar as células.

A criopreservação de sêmen para peixes já é possível e muitas técnicas de manipulação já foram estabelecidas para várias espécies, com especial destaque para os salmonídeos (SCOTT; BAYNES, 1980), silurídeos (LEGENDRE et al., 1996), ciprinídeos (BILLARD et al., 2004), e caracídeos (CAROSFELD et al., 2003). Para crustáceos são poucos os estudos realizados e para peneídeos são ainda mais escassos.

Nas condições naturais, após o acasalamento, os espermatóforos permanecem aderidos por horas ao corpo da fêmea, em contato com o meio externo, antes que ocorra a fecundação. Assim, supõe-se que os espermatozóides destes animais apresentem bom potencial de resistência a um eventual período de conservação do sêmen visando eventuais manejos de inseminação (GOLDBERG, 1998).

## Coleta de espermátóforos

O método de extração do espermátóforo pode ter grande influência na qualidade espermática, além de permitir o reaproveitamento do reprodutor. A técnica de dissecação do macho foi uma das primeiras a serem desenvolvidas e utilizadas para obtenção de espermátóforos, com a qual Clark et al. (1973) obtiveram êxito pela primeira vez na obtenção de larvas resultantes de fertilização “*in vitro*” utilizando de gametas de *Litopenaeus aztecus* a fresco.

Posteriormente, Sandifer e Smith (1980) propuseram a técnica de eletroejaculação, utilizada primeiramente em *Macrobrachium rosenbergii*, e esta tornou-se a mais difundida por ser mais rápida e fornecer o espermátóforo na forma mais similar de como ocorre na natureza. Mais tarde, Wang et al. (1989) também utilizaram-na com sucesso em *Litopenaeus chinensis*. Todavia, Rosas et al. (1993) verificaram que a eletroejaculação compromete a regeneração do espermátóforo no peneídeo *P. setiferus*, e sugerem que o efeito do eletrochoque produz estresse no animal. Pascual et al. (1998) também atribuíram a variabilidade na qualidade de espermátóforos obtidos à eletroejaculação, pois segundo eles, o eletrochoque poderia estar prejudicando as funções testiculares. Uma das possíveis conseqüências seria a melanização do trato reprodutivo masculino com conseqüente redução progressiva no número de células espermáticas (DOUGHERTY; DOUGHERTY, 1990). Assim, apenas espermátóforos não melanizados devem ser selecionados para estudos de preservação a fim de garantir que os resultados não sejam prejudicados pela má qualidade inicial do conteúdo espermático

Atualmente, a extrusão manual é o método mais utilizado devido a simplicidade e praticidade. Em machos maturados nas condições adequadas, o espermátóforo pode ser removido facilmente através de leve pressão na ampola terminal, próximo ao quinto par de pereiópodes. Nakayama et al (2008) observaram maior sobrevivência e qualidade dos espermátóforos regenerados em animais que passaram por extrusão manual do que em animais eletroestimulados, de modo que a primeira técnica possibilita melhor reutilização dos machos. Lezcano et al. (2004), Amrit et al. (2006) Nimrat et al. (2006), Vuthiphandchai et al (2007) obtiveram espermátóforos de boa qualidade com esta técnica.

## Agentes crioprotetores

Para reduzir ou evitar as injúrias induzidas pelas baixas temperaturas é essencial a adição de substâncias que proporcionem uma

crioproteção celular e tecidual durante a redução da temperatura (CASTRO, 2011).

Essas substâncias, conhecidas como agentes crioprotetores, permitem a manutenção da estrutura original da célula espermática, garantindo maiores taxas de sobrevivência (CHAVES et al., 2010).

Trata-se de solventes orgânicos de baixo peso molecular, capazes de penetrar nas células e retirarem a água intracelular a uma taxa que impede a formação de cristais de gelo que possam romper as membranas. Agem em concomitância com os efeitos causados pelo ritmo de congelamento através da diminuição da concentração osmótica do meio diluidor, tornando mais viscoso e permitindo um congelamento relativamente mais lento ao material (HAFEZ, 1995). Além disso, os crioprotetores também atuam prevenindo a exposição do material a altas concentrações de eletrólitos, através da ligação aos próprios eletrólitos ou pela substituição parcial pela água (JAIN; PAULSON, 2006).

Vários compostos já foram utilizados como agentes crioprotetores isoladamente ou em combinação. A escolha do crioprotetor a ser utilizado depende da espécie em questão (GWO, 2000).

Para peneídeos, diversos crioprotetores já foram testados: dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, etilenoglicol, (EG), metanol, trealose, formamida (Tabela 1). Sua eficácia varia entre diferentes tipos celulares. O agente DMSO destaca-se entre os crioprotetores e vem sendo utilizado amplamente em camarões marinhos desde que Anchordoguy et al. (1988) verificaram sua maior eficácia e menor toxicidade espermática para a espécie de camarão marinho *Sicyonia ingentis* quando comparado com glicerol, prolina e trealose. Em 2005, Vuthiphandchai e colaboradores, testaram acetamida, DMSO, etanol, etilenoglicol, formamida glicerol, metanol, propilenoglicol e sacarose como crioprotetores para embriões de *P. monodon*. A acetamida, o DMSO, glicerol e sacarose foram relativamente menos tóxicos para os embriões em comparação aos outros crioprotetores, apresentando sobrevivência de 68,0% a 82,3%. Dimetilsulfóxido, etilenoglicol e metanol foram utilizados para crioconservar espermátóforos da mesma espécie por até 48 horas, e a maior taxa de sobrevivência ( $79,7 \pm 0,4\%$ ) foi observada para o DMSO a 5% (BART; CHOOSUK; THAKUR, 2006) Do mesmo modo, Vuthiphandchai et al. (2007), obtiveram elevada sobrevivência com DMSO (quase 90% de sobrevivência das células espermáticas após 60 dias de congelamento).

Os crioprotetores impedem criolesões, mas quando utilizados em altas concentrações podem apresentar efeitos tóxicos aos

Tabela 1. Resultados de experimentos de criopreservação realizados com camarões.

<b>Espécie</b>	<b>Crioprotetor</b>	<b>Tempo de equilíbrio</b>	<b>Descongelamento</b>	<b>Tempo de congelamento</b>	<b>Sobrevivência (%) / técnica</b>	<b>Autor</b>
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Glicerol 10%	5 e 10 min	30° C	180 min.	>70%/inseminação artificial	Chow et al. (1985)
<i>Sicyonia ingentis</i>	DMSO 5%	-	30° C	-	16-56% / reação acrossômica	Anchordoguy et al. (1988)
<i>Penaeus vannamei</i>	Glicerol 15%	18-25 min. à T°C ambiente	25° C	-	43.5%/inseminação artificial	Dumont et al. (1992)
<i>Penaeus monodon</i>	DMSO 5%	30 min	30° C por 2 min.	2 dias	79% inseminação artificial	Bart; Choosuk; Thakur, (2006)
<i>Penaeus monodon</i>	DMSO 5%	10 min	30° C por 2 min.	60 dias	87%/ coloração eosina-nigrosina	Vuthiphandchai et al. (2007)
<i>Penaeus indicus</i>	DMSO 5% + Glicerol 5%	5 min	20° C	60 dias	67%/ reação acrossômica	Diwan; Joseph (1998)
<i>Penaeus schmitti</i>	Glicerol 5%	10 min	20° C por 10 seg.	30 dias	16,3% / coloração eosina-nigrosina	Chaves (2010)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Metanol 10%	15 min	28° C por 1 min.	2-3 dias	45% / citometria de fluxo	Lezcano (2004)

espermatozóides (MARIA, 2005), motivo pelo qual um pré-teste a fim de avaliar a toxicidade dos crioprotetores às células espermáticas deve ser realizado.

Além disso, o agente crioprotetor deve ser diluído à concentração desejada antes de ser adicionado a suspensão de células. Este procedimento minimiza os efeitos potencialmente deletérios das reações químicas, como a geração de calor, e assegura a exposição mais uniforme para o agente crioprotetor quando ele é adicionado a suspensão de células, reduzindo seus efeitos tóxicos. Uma etapa não menos importante a ser realizada é o tempo de exposição do material biológico à solução crioprotetora escolhida, o chamado tempo de equilíbrio. Diversos períodos de tempo já foram testados para esse fim e a escolha do tempo adequado deve ser testada previamente para evitar a intoxicação das células espermática, mas ao mesmo tempo permitir a penetração do crioprotetor nas células.

Para uma crioproteção mais completa atuando em nível de membrana celular, os crioprotetores intracelulares devem ser combinados com proteção extracelular que revestem a célula externamente e estabilizam a membrana. A gema de ovo e o leite em pó vêm sendo amplamente utilizada para este fim, pois além de serem recursos de baixo custo, funcionam como fonte de nutrientes e atuam como crioprotetores auxiliando na conservação do material biológico (CAROLSFELD, 2003).

Assim como substâncias crioprotetoras são importantes na preservação criogênica, o uso de diluidores é fundamental para manter o equilíbrio osmótico do material e facilitar o contato célula-crioprotetor (MORAES, 2004). Soluções de sais ou carboidratos são utilizadas para tal observando propriedades como isotonia, estabilidade no decorrer do armazenamento e esterilidade.

## **Velocidades de Congelamento e Descongelo**

A velocidade de congelamento a ser aplicada deve levar em consideração o material que se pretende criopreservar (massa espermática, espermátóforo completo, suspensão celular, embriões). As metodologias até hoje testadas apresentam grande variação entre crustáceos. Porém, há um consenso sobre o fato de que taxas rápidas de congelamento, ao submergir-se o material biológico diretamente no nitrogênio líquido, por exemplo, tendem a danificar as células. (DUMONT et al., 1992, BHAVANISHANKAR; SUBRAMONIAM,

1997, LEZCANO et al., 2004; WOODS et al., 2004, VUTHIPHANDCHAI et al., 2007).

A exposição do esperma ao vapor de nitrogênio anteriormente à sua imersão no nitrogênio líquido é a alternativa utilizada quando não estão disponíveis congeladores programáveis para otimizar a taxa de congelamento. Tal técnica é utilizada com eficácia desde os primeiros experimentos com ciopreservação (LANNAN, 1971; CHOW et al., 1985; JEYALECTUMIE; SUBRAMONIAM, 1989; BHAVANISHANKAR; SUBRAMONIAM, 1997).

Jeyalectumie e Subramoniam (1989) obtiveram maior sucesso de viabilidade ao expor os espermatozoides por uma hora ao vapor do nitrogênio do que quando mergulharam-nos diretamente no líquido. Do mesmo modo Akarasanon et al. (2004), alcançaram melhores índices de sobrevivência ao resfriar o material biológico até  $-70^{\circ}\text{C}$ , seguido de exposição ao vapor e, por fim, submergi-los. Lezcano et al. (2004) ratifica tal suposição ao testar dois protocolos com velocidades de congelamento distintas utilizando-se de freezer programável. Ao testar uma rápida taxa de congelamento (cerca de  $-10^{\circ}\text{C}\cdot\text{seg}^{-1}$ ) para massa espermática de *L. vannamei*, obteve eversão em 90% das células observadas, independente do crioprotetor usado. Os mesmos autores propõem um ajuste da taxa para  $0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  até  $-0,6^{\circ}\text{C}$ , depois até  $-32^{\circ}\text{C}$ , e só então transferir para o N líquido.

Quanto ao processo de descongelamento, os experimentos utilizam banho-maria com temperaturas que variam entre  $20^{\circ}\text{C}$  a  $30^{\circ}\text{C}$ , por tempos distintos. Porém, esta etapa parece não ser tão preocupante, pois não existem discussões a respeito da mesma e raramente são utilizadas para justificar baixas taxas de sobrevivência espermática.

### **Experimentos com camarões**

Estudo realizado por Chow (1982) com a espécie de água doce *Macrobrachium rosenbergii* obteve a inseminação artificial de fêmeas com espermatozoides conservados sob refrigeração ( $2^{\circ}\text{C}$ ) durante 95 horas. Já a submissão a nitrogênio líquido implica em temperaturas de aproximadamente  $-196^{\circ}\text{C}$  por tempo indeterminado, tornando necessário maiores cuidados na manipulação do material, já que a excessiva desidratação e o rompimento da membrana pela formação de cristais de gelo intra e extracelulares são danos comuns ao utilizar-se metodologia inadequada (JEYALECTUMIE; SUBRAMONIAM, 1989).

Em 1985, Chow e colaboradores obtiveram sucesso na inseminação de 33% dos espermatozoides criopreservados de *M.*

*rosenbergii*, utilizando glicerol 10% como crioprotetor e um pré-congelamento de 5 ou 10 minutos seguido do congelamento que durou 30 dias e descongelamento em água corrente à temperatura ambiente. Anchoroguy et al. (1988) inferiu uma sobrevivência de 56% com a técnica de reação acrossômica para espermátóforos de *S. ingentis* após um mês de congelamento em nitrogênio líquido utilizando DMSO a 5%.

Em 2001, Alfaro e colaboradores aplicaram DMSO como agente protetor para embriões do peneídeo *Trachypenaeus byrdi*, e observaram que o agente não ocasionou decréscimo na taxa sobrevivência embrionária; contrastando com sacarose e glicerol, ambos com efeitos deletérios aos embriões.

Akarasanon et al. (2004) conservaram espermátóforos de *M. rosenbergii* por até 350 dias a  $-196^{\circ}\text{C}$  utilizando etilenoglicol como crioprotetor. Porém, apenas a inseminação com as amostras descongeladas após 150 dias obteve sucesso. Neste experimento, o etilenoglicol a 20% foi considerado um protocolo satisfatório para criopreservação a longo prazo de células espermáticas de *M. Rosenbergii*.

Células espermáticas em suspensão de *Penaeus indicus* foram criopreservadas por Diwan e Shoji (1999) por até 60 dias, e uma sobrevivência superior a 60% foi obtida utilizando DMSO + Glicerol para crioproteção.

Goldberg (1998) observou viabilidade espermática em 64,8% do sêmen de *M. rosenbergii* estocado em vapor de nitrogênio líquido por até 12 semanas, apontando a validade de levar experimentos semelhantes adiante a fim de verificar o real potencial da técnica para o fim a que se destina no presente caso.

### **Avaliação da integridade espermática após o descongelamento**

Avaliar a condição espermática do material criopreservado é uma dificuldade adicional encontrada na experimentação com invertebrados. Segundo Salazar et al. (2008), este é um dos principais inconvenientes para a criopreservação de sêmen de peneídeos. Devido a ausência da motilidade espermática, parâmetro normalmente utilizado para análise da viabilidade, assim como a ausência de um padrão morfológico típico, as análises microscópicas tornam-se difíceis, e faltam métodos confiáveis, para a determinação da sobrevivência celular após o descongelamento. De modo geral, as técnicas de armazenamento do espermátóforo são avaliadas por testes de inseminação ou por análise de viabilidade das células do espermátóforo submetido à criopreservação (GOLDBERG, 1998).



As técnicas de coloração seletiva ou sondas fluorescentes, que marcam especificamente células viáveis ou não viáveis são um método simples de avaliação. Métodos como coloração-resposta com eosina-nigrosina (JEYALECTUMIE; SUBRAMONIAM, 1989; VUTHIPHANDCHAI et al., 2005, NIMRAT et al., 2008), corante pós-vital (GOLDBERG, 1998), azul de tripano (LEUNG-TRUJILLO; LAWRENCE, 1987; ROSAS et al., 1993; PASCUAL et al., 1998; AKARASANON et al., 2004), indução de reação acrossômica (ANCHORDOGUY et al., 1988) com posterior observação microscópica já foram testados. Esta última avalia o dimorfismo causado pela reação acrossômica, típica de espermatozoides de invertebrados, induzida “*in vitro*” mediante contato da massa espermática com água provida de um ambiente de recente desova (GRIFFIN, 1987).

Contudo, Bhavanishankar e Dubramoniam (1997) sugerem que as técnicas de coloração baseadas no princípio de que células íntegras ou viáveis não são coradas não podem ser tidas como bons índices de sobrevivência de gametas. As membranas de espermatóforos e espermatozoides possuem diferentes permeabilidades seletivas para diferentes tipos de corantes, e normalmente, tais técnicas tendem a superestimar o número de células viáveis (WANG, 1995). Outra alternativa já testada é a verificação da reação acrossômica do esperma quando colocado em contato com solução contendo substâncias derivadas de ovos de fêmeas maduras. Tal reação ocorre de forma similar ao espermatozoide na superfície de desovas recentes de fêmeas a serem fecundadas (WANG et al., 1995, DIWAN; SHOJI, 1999).

Dentre os ensaios de avaliação de esperma atualmente utilizados em espécies aquáticas, a avaliação da integridade de membrana e potencial de membrana mitocondrial vem apresentando melhores aplicações. Um dos mais utilizados em espécies aquáticas é o SYBR 14 iodeto de propídeo (PI) para avaliar integridade de membrana, ou mais comumente chamado ensaio de viabilidade espermática. Diversos estudos utilizaram essa técnica para analisar qualidade espermática em amostras frescas e descongeladas a fim de avaliar o sucesso de protocolos de ciopreservação (LEZCANO et al., 2004; CABRITA et al., 2005; PANIAGUA-CHÁVEZ et al., 2006,).

Entre os métodos mais modernos que vêm sendo testados, destaca-se a citometria de fluxo, que vem sendo aplicada na biologia reprodutiva para examinar integridade de membrana e as características das células espermáticas após o congelamento. Atualmente foi utilizada em diversos trabalhos com bivalves (ADAMS et al., 2003;

PANIÁGUA-CHAVEZ et al., 2006), peixes (de BAULNY et al., 1997; SEGOVIA et al., 2000; CABRITA et al., 2005) e camarões (LEZCANO et al., 2004) com o objetivo de avaliar a qualidade das amostras antes e após diferentes tratamentos.

A técnica de citometria de fluxo baseia-se na coloração com um intercalante de DNA, como o iodeto de propídeo supracitado, capaz de penetrar apenas em células que perderam controle da permeabilidade da membrana por rompimento ou células mortas, resultando na emissão de uma fluorescência amarela e vermelha; enquanto que células viáveis não sofrem marcação. Dessa forma, a exclusão do iodeto de propídeo torna-se eficiente para detecção da integridade de membrana (SILVA et al., 2001).

Associada ao uso do iodeto de propídeo (PI), a avaliação da integridade celular através da citometria de fluxo permite a análise de 10000 células em poucos segundos. A análise dos dados é obtida com auxílio de softwares específicos, podendo ser capaz de avaliar diferentes parâmetros individualmente em cada partícula de uma suspensão através da indução de um fluxo partícula a partícula (SILVA et al., 2001). Segundo os autores, apresentou-se como uma técnica de alta sensibilidade e de menor subjetividade na análise da viabilidade do material reprodutivo (LEZCANO et al., 2004).

Contudo, faz-se necessária a validação da técnica para analisar viabilidade espermática em animais invertebrados, pois a técnica de citometria de fluxo é amplamente difundida para análise de qualidade espermática de mamíferos, e apenas ultimamente vem sendo explorada com invertebrados (MARTINEZ–PASTOR et al., 2010).

Assim, dada a escassez de pesquisas sobre biotecnologias de reprodução de peneídeos, este trabalho pretende verificar a possibilidade de criopreservar o sêmen da linhagem local de *L. vannamei* por longo prazo testando diferentes soluções crioprotetoras; e com posterior análise da integridade celular utilizando duas técnicas: coloração com eosina-nigrosina e citometria de fluxo.

## JUSTIFICATIVA

---

Com o aparecimento do quadro de doenças nos cultivos de camarões em Santa Catarina e, conseqüentemente, o desenvolvimento de uma legislação mais rígida, as populações da espécie *Litopenaeus vannamei* já bem adaptadas às condições locais de cultivo estão sujeitas a períodos de vazio sanitário que, como consequência, traz a eliminação

dessa população já domesticada. A preservação adequada a médio e longo prazo do material genético da linhagem de *L. vannamei* para a qual as tecnologias de cultivo já são dominadas é de grande importância, de modo que a carcinicultura no estado não venha a depender apenas da importação de larvas não adaptadas às condições de cultivo locais. Além disso, a manutenção desse material favorece programas de melhoramento genético em espécies de interesse econômico. As biotecnologias de reprodução, dentre elas a criopreservação, têm como objetivo principal otimizar o aproveitamento dos gametas masculinos e femininos e a produção de indivíduos de origem conhecida (CHAVES, 2010). O congelamento do esperma também permite suprimento constante do sêmen, além de diminuir o número de machos no cultivo (GWO, 2000), e com isso, reduzir custos com mão-de-obra, espaço e manutenção dos reprodutores.

## **OBJETIVOS**

---

### **Objetivo Geral**

Avaliar o potencial e as limitações da técnica de criopreservação por tempo prolongado de espermátóforos de *Litopenaeus vannamei*.

### **Objetivos Específicos**

- Verificar a integridade de células espermáticas de *L. vannamei* submetidas ao nitrogênio líquido durante diferentes tempos de estocagem e com diferentes soluções crioprotetoras.

- Avaliar a integridade dos espermátóforos após o descongelamento através de dois métodos: coloração com eosina-nigrosina e citometria de fluxo.

- Analisar se há correlação entre os métodos de avaliação de integridade espermática utilizados no experimento.

## **FORMATAÇÃO DA DISSERTAÇÃO**

---

A dissertação está dividida em dois capítulos. O primeiro referente a introdução e revisão de literatura. O seguinte corresponde ao artigo que será submetido à revista científica *Aquaculture Research* e encontra-se formatado conforme as normas desta revista.

## Capítulo 2

### AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE *Litopenaeus vannamei* SUBMETIDAS A CRIOPRESERVAÇÃO.

*Marcela Fornari Uberti<sup>a</sup>, Felipe do Nascimento Vieira<sup>a</sup>,  
Helena Ragibo Salência<sup>a</sup>, Genyess da Silva Vieira<sup>a</sup> e Luis Alejandro  
Vinatea<sup>a</sup>*

*<sup>a</sup>Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis - SC  
Endereço para correspondência – Laboratório de Camarões  
Marinhos-LCM, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências  
Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, CP: 476,  
Servidão dos Coroas, fundos, Barra da Lagoa, CEP 88062-601  
Florianópolis, SC, Brasil  
E-mail: marcelauberti@gmail.com*

## RESUMO

---

A fim de avaliar o potencial de criopreservação para células espermáticas de *Litopenaeus vannamei*, 74 espermatóforos foram extraídos manualmente de indivíduos sexualmente maduros. Após teste de toxicidade para definir concentração dos crioprotetores, suspensões de células espermáticas foram criopreservadas em grupos com solução de congelamento contendo crioprotetores distintos: dimetilsulfóxido (DMSO) e etilenoglicol (EG) ambos à concentração de 10%. Cada tratamento foi dividido em subgrupos para estocagem em nitrogênio líquido por diferentes períodos de tempo: 0, 30, 60 e 90 dias, em triplicata. Após o descongelamento em banho Maria a 25°C por cerca de 40 segundos, a integridade celular das suspensões foi analisada sob microscopia com coloração por eosina-nigrosina, e por citometria de fluxo. Não observou-se diferença significativa entre os crioprotetores utilizados. Para todos os tratamentos, as menores e as maiores mortalidades ocorreram em 0 e 90 dias, respectivamente. Através da técnica de coloração, a menor e a maior mortalidade foram, 23,17% e 82,11% com DMSO e 29,94% e 83,72% com EG. Com citometria de fluxo as mortalidades foram 2,42% e 55,13% com DMSO; e 0,90% e 55,56% com EG. O coeficiente de correlação de Spearman indicou correlação positiva ( $R=0,91$ ) entre as duas técnicas utilizadas. Concluiu-se que houve queda considerável da integridade celular com o aumento do tempo de criopreservação.

Palavras-chave: criogenia, sêmen, camarão marinho, viabilidade celular.

## ABSTRACT

---

In order to assess the feasibility of long-term cryopreservation of sperm cells from *Litopenaeus vannamei*, 74 spermatophores were manually extracted from sexually mature individuals. After toxicity test to define the concentration of cryoprotectants to be used, suspensions of spermatophores were cryopreserved on groups with cryopreservation solutions containing distinct cryoprotectors: dimethylsulfoxide (DMSO) and ethylene glycol (EG), both at 10% concentration. For each treatment, spermatophores were divided into subgroups for storage in liquid nitrogen for different periods: 0, 30, 60 and 90 days, in triplicate. After thawing by putting cryovials on water at 25°C for 40 seconds, the suspensions were analyzed for cellular integrity under microscopy by staining with eosin-nigrosin, and by flow cytometry. No significant difference was detected between the cryoprotectants used. Through the staining technique, the lowest and highest mortality were, respectively from 0 and 90 days, 23,17% and 82,11% with DMSO and 29,94% and 83,72% with EG. With flow cytometry, the mortalities were 2,42% and 55,13% using DMSO; and 0,90% and 55,56% with EG at 0 and 90 days, respectively. Spearman correlation coefficient indicated a positive correlation ( $R = 0,91$ ) between the two techniques. It was concluded that the cell integrity declined considerable with the increased period of cryopreservation.

Keywords: Criogenics, sperm suspension, shrimp, cellular viability.

## INTRODUÇÃO

---

Sendo a espécie *Litopenaeus vannamei* responsável pelas principais produções comerciais da carcinicultura no Brasil e no mundo (FAO, 2010), tornam-se de grande importância investimentos em estudos de tecnologias que permitam explorar o potencial produtivo desta espécie, que facilitem a produção de pós-larvas da mesma e que permitam a manutenção de linhagens genéticas.

As biotecnologias de reprodução têm como objetivo principal otimizar o aproveitamento de gametas masculinos e femininos, e a produção de indivíduos de origem conhecida, priorizando as qualidades genéticas parentais. Biotécnicas que permitam estocagem de sêmen a longo prazo são importantes para a realização de diversos processos tais como hibridização, domesticação, conservação de populações e seleção genética, favorecendo assim programas de melhoramento genético em espécies de interesse econômico (Gwo, 2000).

Nesse contexto, a criopreservação de sêmen aparece com uma alternativa interessante desde que observada sua factibilidade, os recursos disponíveis para adoção da técnica, e as limitações da mesma quanto ao período de armazenamento do material. O congelamento do sêmen em nitrogênio líquido garante estabilidade celular permitindo suprimento constante de sêmen com pouca mão-de-obra e espaço reduzido, sem as limitações sazonais de reprodução e menor custo na manutenção de reprodutores ao diminuir o número de machos reprodutores da criação (Gwo, 2000).

A criopreservação de sêmen para peixes já é possível e muitas técnicas de manipulação já foram estabelecidas para várias espécies, com especial destaque para os salmonídeos (SCOTT; BAYNES, 1980), silurídeos (LEGENDRE et al., 1996), ciprinídeos (BILLARD et al., 2004), e caracídeos (CAROSFELD et al., 2003). Já para crustáceos, e principalmente peneídeos, são escassos os estudos realizados nesse sentido. Assim, este trabalho objetivou verificar a possibilidade de criopreservar o sêmen da espécie *L. vannamei* em longo prazo (0, 30, 60 e 90 dias) testando dois agentes crioprotetores distintos: dimetilsulfóxido (DMSO) e etilenoglicol (EG); com posterior análise da integridade celular utilizando duas técnicas complementares: coloração com eosina-nigrosina e citometria de fluxo.

## MATERIAIS E MÉTODOS

---

O experimento foi realizado no Laboratório de Camarões Marinheiros (LCM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Posteriormente, a análise de integridade do material descongelado procedeu-se no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) e no Laboratório de Microscopia de Fluorescência do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (FluorBEG) desta mesma Universidade.

### Material biológico

Foram utilizados camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*, de linhagem livres de patógenos específicos (SPF, do inglês *Specific Pathogen Free*) de notificação obrigatória pela Organização Internacional de Epizootias (OIE), provenientes da Genearch Aquacultura LTDA (localizada em Rio do Fogo/RN, Brasil) e cultivados no LCM-UFSC em sistema superintensivo de bioflocos. Após o período de maturação, foram selecionados machos visualmente saudáveis (Anexo 1).

### Manutenção dos reprodutores

Os animais utilizados neste experimento foram mantidos no setor de maturação do LCM por um período de 45 dias. Foram estocados 100 animais, na proporção 1 macho: 1 fêmea em seis tanques de 6000L, sob fotoperíodo artificial de 13hs luz : 11hs escuro. A renovação de 150% água dos tanques era realizada diariamente para manutenção da qualidade da mesma e eliminação de restos de alimentos. A alimentação foi fornecida oito vezes ao dia (8:00h, 10:00h, 12:00h, 14:00h, 17:00h, 21:00h, 24:00h e 3:00h) alternando-se alimento fresco (lula 3 vezes ao dia e marisco 2 vezes ao dia) e ração (2x) comercial para maturação (Breed S, INVE<sup>®</sup>) até a saciação dos animais. A concentração de oxigênio dissolvido, temperatura, pH e salinidade nos tanques de maturação foram monitoradas diariamente através de oxímetro YSI 55, pHmetro digital e salinômetro YSI 30. A salinidade e temperatura foram mantidas a 33-35‰ e 28-29°C, respectivamente, e oxigênio dissolvido e pH, 6-7 mg.L<sup>-1</sup> e aproximadamente 7,0 respectivamente.



## **Preparação dos gametas**

Os animais cujos espermatozóides foram utilizados no experimento apresentaram peso de  $42,6\text{g} \pm 3,39\text{g}$ , e o peso dos espermatozóides foi de  $0,033\text{g} \pm 0,0034\text{g}$ .

Após a biometria dos indivíduos sexualmente desenvolvidos utilizados no experimento, os espermatozóides completamente maduros foram extraídos manualmente através de leve pressão na ampola terminal conforme metodologia utilizada por Lezcano et al. (2004), sendo descartados quando melanizados. A seguir, procedeu-se a pesagem de todos os espermatozóides. Posteriormente, os mesmos foram submetidos a agitação mecânica em 1 mL de água do mar estéril (SSW, 35 ppm) a fim de obter uma suspensão do espermatozóide fresco (Bhavanishankar & Subramoniam, 1989).

## **Efeito dos agentes crioprotetores sobre a integridade celular**

Para identificar quaisquer efeitos tóxicos dos crioprotetores, adicionou-se à suspensão de espermatozóide os crioprotetores DMSO e EG a concentrações finais de 5%, 10% e 20% (proporção 2:1) em SSW.

As amostras contendo crioprotetores em diferentes concentrações foram analisadas em triplicata, tomando-se a suspensão espermática em SSW como controle. A integridade espermática foi avaliada através de microscopia ótica (aumento de 400 x), contando-se um número mínimo de 100 células por amostra com o auxílio de câmara de Neubauer, em diferentes momentos: 5 minutos, 15 minutos e 30 minutos após a exposição às soluções crioprotetoras (tempo de equilíbrio para permitir penetração completa do agente crioprotetor).

Considerando a presença de uma estrutura em forma de espinho nas células espermáticas normais e viáveis dos camarões, a integridade foi expressa como uma porcentagem de células contendo espinho sobre o total de células observadas (com espinho, sem espinho e células evertidas) conforme metodologia de Lezcano (2004) (Anexo 2).

## **Desenho experimental**

Determinada a concentração ideal dos agentes crioprotetores nas suspensões de células espermáticas, procederam-se as coletas para criopreservação. Do total de 74 espermatozóides, dois foram utilizados como controle, obtidos através criopreservação da suspensão espermática sem agente crioprotetor.

Os 72 espermatozóides restantes foram divididos em dois tratamentos com crioprotetores distintos, selecionados com base em testes de toxicidade de crioprotetores realizado para peneídeos por diversos autores (Gwo et al., 1998; Alfaro et al., 2001; Lezcano et al., 2004; Vuthiphandchai et al., 2007): para um grupo de espermatozóides foi utilizado o DMSO e para o outro EG, ambos à concentração de 10%, e um tempo de equilíbrio de 10 minutos, com base nos pré-testes de toxicidade dos mesmos.

Para cada tratamento os espermatozóides foram divididos em subgrupos de três para estocagem em nitrogênio líquido durante diferentes períodos de tempo: 0, 30, 60, 90 dias. O tratamento tempo zero consistiu na imersão das amostras em nitrogênio líquido e retirada imediata. Dois espermatozóides foram tomados como controles, submetidos ao nitrogênio líquido sem o agente crioprotetor. Os tratamentos foram realizados em triplicata (Tabela 2).

**Tabela 2:** Delineamento experimental para criopreservação de espermatozóides de *Litopenaeus vannamei* com os crioprotetores Dimetilsulfóxido (DMSO) e Etilenoglicol (EG) durante diferentes períodos de tempo.

<b>Tratamento (Crioprotetor)</b>	<b>Tempo de congelamento (dias)</b>	<b>Quantidade de espermatozóides</b>
<b>Controle</b>	-	2
<b>DMSO</b>	0	9
	30	9
	60	9
	90	9
<b>EG</b>	0	9
	30	9
	60	9
	90	9

### **Preparação das amostras para criopreservação**

Das suspensões de células espermáticas preparadas conforme mencionado anteriormente foram aliqüotados 500µL, e transferidos para criotubos devidamente identificados contendo 500µL de solução de congelamento (5% de gema de ovo e sacarose 0,2 M) (Lezcano et al., 2004). Posteriormente, adicionou-se 25 µL dos crioprotetores (DMSO ou EG à concentração final 10%), deixou-se a solução estabilizar por 5 minutos, e adicionou-se mais 25 µL dos crioprotetores, conforme

tratamento, para perfazer os 10% da concentração final, totalizando 50  $\mu\text{L}$  de crioprotetor. O controle deu-se através de suspensões celulares contendo solução de congelamento (5% de gema de ovo e sacarose 0,2 M) sem adição de crioprotetores.

O material foi encaminhado ao pré-congelamento no qual os *cryovials* foram mantidos a 3 cm acima da camada de nitrogênio líquido por cerca de 5 minutos conforme proposto por Akarasanon et al. (2004), e imediatamente submersos no nitrogênio líquido onde foram armazenados em botijão à temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$ . O botijão foi reabastecido periodicamente para manutenção do nível adequado de nitrogênio líquido.

### **Descongelamento**

O descongelamento após os diferentes períodos de tempo (0, 30, 60 e 90 dias) deu-se através da retirada dos frascos de dentro do botijão e sua imersão em água a  $20-25^{\circ}\text{C}$  por 40 segundos, tomando-se por base a metodologia de Akarasanon et al. (2004). Logo, o material foi homogeneizado, ressuspensionado em solução de sacarose a 0,2M e preparado para avaliação da integridade celular.

### **Avaliação da integridade celular**

As amostras de solução espermática foram subaliquotadas para avaliação da sobrevivência através de duas técnicas complementares: esfregaço de sêmen corado com eosina-nigrosina de acordo com Jeyalectumie e Subramoniam (1989) e análise por citometria de fluxo (FACS), seguindo protocolo proposto por Lezcano (2004).

Para a primeira, foram adicionados 25  $\mu\text{L}$  de eosina a 0,5% e 25  $\mu\text{L}$  de nigrosina a 10%, em 50 $\mu\text{L}$  de solução espermática. Fez-se um esfregaço dos 100  $\mu\text{L}$  restantes de solução corada em lâmina de microscopia, com posterior secagem ao ar para observação em microscópio óptico com aumento de 400x. Células coradas pela eosina (rosáceas) eram consideradas mortas, enquanto células vivas não apresentavam coloração, sendo estas translúcidas. O percentual médio de sobrevivência foi obtido através da contagem mínima de 100 células por lâmina (duas réplicas por amostra).

Para a citometria de fluxo, realizou-se uma nova coleta de espermatóforos, seguindo os mesmos procedimentos descritos, que foram utilizados como amostra de referência de material fresco no citômetro de fluxo, para que o mesmo pudesse posteriormente reconhecer o padrão das células espermáticas a serem avaliadas.

Uma vez otimizadas as condições da FACS, as suspensões celulares descongeladas foram analisadas após incubação com iodeto de propídeo (PI) (Sigma 5 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) no escuro por 10 minutos à temperatura ambiente, conforme orientação de protocolo do fabricante. Células com membranas rompidas permitem a passagem do PI emitindo fluorescência, enquanto células íntegras não sofrem marcação. Aproximadamente 20 mil eventos foram analisados em cada amostra, e a fluorescência foi analisada com filtro de 610 nm. Os dados obtidos na FACS foram analisados com o software *FlowJo* versão 7.6.5, e expressos em percentuais de sobrevivência. Os gráficos representativos desta análise encontram-se no Anexo 3.

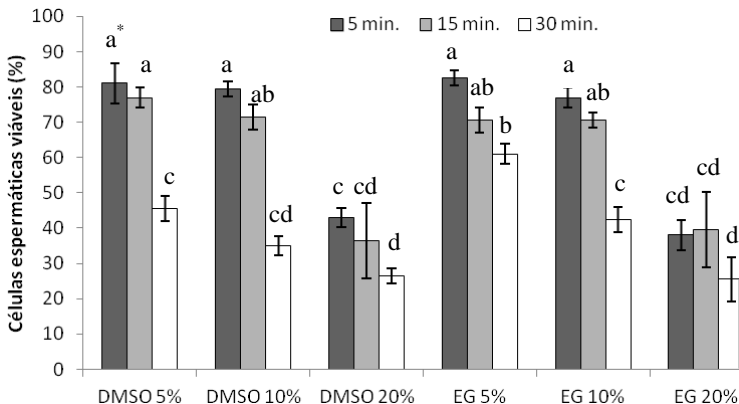
### **Análises estatísticas**

Os dados percentuais obtidos do teste de toxicidade dos crioprotetores e da sobrevivência após a criopreservação através da citometria de fluxo e da coloração com eosina e nigrosina foram transformados em arco-seno e submetidos a Análise de Variância (ANOVA) em parcelas subdivididas no tempo ( $\alpha < 0,05$ ). Uma vez encontrada diferença significativa entre os tratamentos, foi utilizado o teste Student Newman Keuls de separação de médias ( $\alpha < 0,05$ ). A análise de correlação entre as duas metodologias foi analisada através do coeficiente de Spearman ao nível de significância de 0,05 (Zar, 1994).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

Nos pré-testes de toxicidade dos crioprotetores utilizados, os resultados obtidos não apontam diferença significativa na sobrevivência espermática entre os crioprotetores DMSO e EG nas concentrações 5% e 10% e para os tempos de equilíbrio de 5 e 15 minutos (Figura 1). Porém, observou-se uma redução na integridade celular ao expor as amostras aos crioprotetores durante 30 minutos. Do mesmo modo, reduções significativas ( $p=0,0042$ ) foram observadas ao utilizar-se concentração 20% de crioprotetor em todos os tempos de equilíbrio.



**Figura 1:** Integridade das células espermáticas de *Litopenaeus vannamei* após exposição aos crioprotetores dimetilsulfóxido (DMSO) e etilenoglicol (EG) em diferentes concentrações (5%, 10% e 20%) durante diferentes tempos de equilíbrio (5, 15 e 30 minutos). Células com presença de espinho foram consideradas íntegras. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste SNK de separação de médias ( $p < 0,05$ )

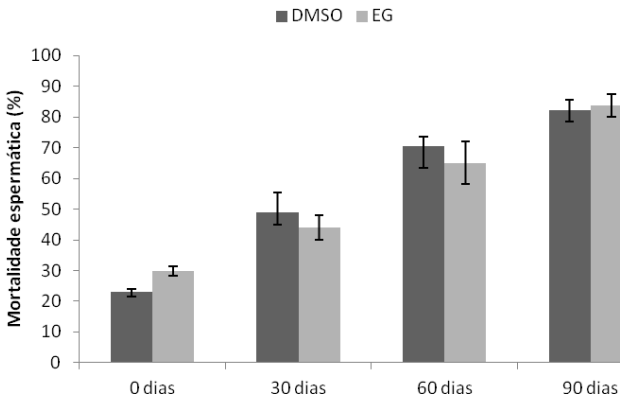
Diferentes tempos de equilíbrio (10, 20, 30 e 60 minutos) foram testados com diversos crioprotetores para sêmen de *P. monodon* (Vuthiphandchai et al., 2007). Assim como no presente trabalho, os autores observaram mortalidade das células espermáticas com aumento da concentração do crioprotetor e do tempo de exposição, tendo determinando como concentração do agente e tempo de equilíbrio ótimos, 10% e 10 minutos, respectivamente.

Barth et al. (2006) trabalhando com camarão tigre, *P. monodon*, utilizaram DMSO nas concentrações de 5% e 10%, como agente crioprotetor. Os autores encontraram o DMSO 5% como melhor resultado ao obter sobrevivência espermática de 79,7%. Diferentemente deste trabalho, observaram que o aumento na concentração do DMSO para 10% provocou a redução na sobrevivência dos espermatozoides.

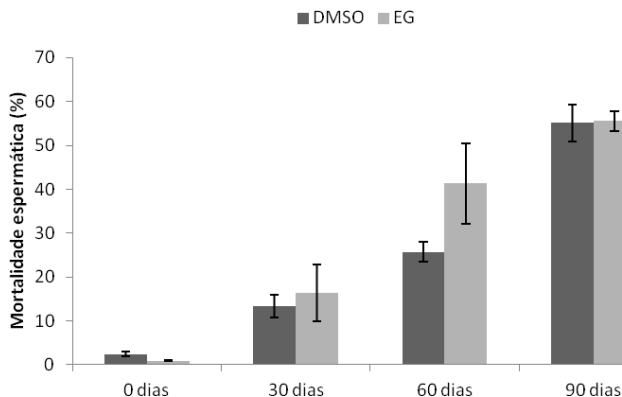
Também quanto ao potencial tóxico dos agentes crioprotetores na sobrevivência espermática, o trabalho de Chow et al. (1985) corrobora com os dados encontrados neste experimento. Ao testar sete diferentes tempos de estabilização (0, 10, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos) com glicerol 10% para *M. rosenbergii*, concluíram que o tempo de equilíbrio é de suma importância para garantir a penetração total do agente no material biológico. Porém, ressaltam que o contato prolongado das

células espermáticas com o agente crioprotetor pode ter efeitos negativos, potencializando a toxicidade do mesmo, já que com 60 minutos de equilíbrio a viabilidade decresceu significativamente. Isso porque, quando há exposição prolongada aos crioprotetores, as células passam a degradá-los, gerando metabólitos potencialmente tóxicos, sendo este um fator limitante para o sucesso da utilização dos mesmos (Fahy, 2010).

A estimativa da mortalidade obtida através da técnica de coloração eosina-nigrosina foram semelhantes entre os crioprotetores DMSO e EG ( $p=0,496$ ) na concentração de 10%. Para os dois crioprotetores utilizados e para ambas as técnicas de avaliação da integridade celular ficou evidente o decréscimo da sobrevivência com o aumento do tempo de criopreservação, ou seja, quanto maior o tempo de manutenção do material em nitrogênio líquido, maior foi a mortalidade celular (Figura 2). As análises estatísticas dos dados de citometria de fluxo também não apontaram diferença significativa entre os crioprotetores DMSO e EG ( $p=0,0524$ ).



**Figura 2:** Percentual de mortalidade das células espermáticas de *Litopenaeus vannameii* através da técnica de coloração eosina-nigrosina, após criopreservação com dimetilsulfóxido (DMSO) e etilenoglicol (EG) por diferentes períodos de tempo (0, 30, 60 e 90 dias).



**Figura 3:** Células positivas para o Iodeto de Propídeo (PI positivas, consideradas não íntegras ou mortas através da técnica de citometria de fluxo) após criopreservação com dimetilsulfóxido (DMSO) e etilenoglicol (EG) por diferentes intervalos de tempo (0, 30 60 e 90 dias).

O tempo de armazenamento do sêmen foi relativamente curto ao considerarem-se as necessidades práticas e as aplicações da criopreservação, que têm por intuito manter o material viável armazenado e disponível por longos períodos. Porém, em se tratando de uma pesquisa experimental, poucos trabalhos nesta área testaram períodos superiores a 30 dias de congelamento, já que geralmente priorizam gerar protocolos de criopreservação e não avaliar o efeito do congelamento em longo prazo. É perceptível que os protocolos ainda precisam ser melhor investigados, e principalmente melhor descritos para que sejam reproduzíveis, e assim minimizar a aleatoriedade dos resultados.

Pode-se considerar que esta pesquisa foi um primeiro passo no sentido de avaliar não só os protocolos, mas os efeitos da criopreservação por diferentes períodos de tempo sobre o sêmen de camarões peneídeos.

Diferentemente deste experimento, o qual não observou diferença na sobrevivência entre o DMSO e EG em ambos testes de integridade celular, Anchoroguy e colaboradores (1988) verificaram maior sobrevivência espermiática ao utilizar DMSO como crioprotetor quando comparado a outros agentes (glicerol, trealose, sacarose e prolina) para esperma de *Sycionia ingentis*. Já um ensaio mais recente de Salazar et al. (2008), assim como neste estudo, também não encontrou diferenças significativas entre os agentes crioprotetores DMSO, glicerol, metanol e

etilenoglicol a 10%, trabalhando com massa espermática de *L. vannamei*.

Estudo realizado com *M. rosenbergii*, observou que a qualidade espermática apresentou declínio significativo sob criopreservação a temperatura de -20°C com EG a 20%. Já na submissão a -196°C, esse declínio foi mais sutil (Akarasanon et al., 2004). Tal fato também pode estar relacionado com o potencial tóxico dos crioprotetores sob temperaturas mais elevadas.

Espermatóforos do camarão *S. serrata* foram criopreservados a -196°C por até 30 dias, apresentando sobrevivência espermática de 89% avaliada através da técnica de coloração eosina-nigrosina, e utilizando DMSO como crioprotetor (Jeyalectumie et al., 1989). Tais valores de sobrevivência foram superiores aos encontrados no presente experimento e estimados pela mesma técnica de eosina-nigrosina (51,11%), porém, apresentaram resultados semelhantes quando a sobrevivência foi estimada através da citometria de fluxo (86,63%). Todavia, vale ressaltar que o experimento supracitado utilizou espermatóforos completos, e não suspensões celulares como o presente estudo.

O teste de Spearman revelou uma correlação positiva (0,91) entre os dois métodos de avaliação de integridade espermática utilizados ( $p < 0,05$ ). Ainda que a análise da integridade celular com a citometria de fluxo tenha resultado em maior sobrevivência, ambas as técnicas demonstraram um perfil de mortalidade semelhante com o decorrer do tempo de criopreservação.

Comparações diretas de resultados entre estudos distintos são problemáticas, se não impossíveis, devido à grande variabilidade na preparação de amostras, coloração e protocolos de citometria de fluxo (Tiersch & Green, 2011). Os mesmos autores relatam que, dentre 15 estudos que avaliaram integridade de membrana utilizando marcador fluorescente SYBR 14/Iodeto de Propídeo nos últimos 10 anos, houve variação considerável ou falha ao relatar detalhes nos procedimentos como a concentração de esperma, a concentração da coloração, e coleta de outros parâmetros temporais como o tempo entre a coleta ou o descongelamento e a análise propriamente dita, duração dos tratamentos, e tempo entre a coloração e a avaliação citométrica de fluxo.

De fato, durante as análises de citometria percebeu-se certa dificuldade em identificar uma população celular homogênea, que pudesse ser caracterizada por um único tipo celular (no caso, células espermáticas de *L. vannamei*). Uma das possíveis razões para essa



limitação pode ter sido o método utilizado para obtenção da suspensão celular, no qual o espermátóforo completo é agitado em vórtex para permitir a liberação das células. Porém, fragmentos do próprio invólucro do espermátóforo também eram soltas, misturando-se a suspensão celular. Tais fragmentos podem ter sido captados pelo citômetro de fluxo junto às células e resultado nessa heterogeneidade das populações detectadas pelo citômetro. Neste ponto, métodos que possibilitem manter a amostra mais homogênea podem ser explorados como uma filtragem do material ou uma separação que garanta que apenas células espermáticas estarão sendo avaliadas.

Outro ponto a ser mencionado diz respeito ao modo como o material biológico em si é submetido às temperaturas baixas. Lezcano et al. (2004) avaliaram protocolos e resultados de criopreservação do espermátóforo completo, da massa espermática e de suspensão celular, e obtiveram melhores resultados de preservação do espermátóforo completo utilizando metanol a 10%, tanto com técnica de análise de morfotipo quanto através de citometria de fluxo. Tal resultado observado no estudo supracitado pode indicar que o tecido que envolve o espermátóforo pode estar atuando de forma a proteger as células espermáticas submetidas a criopreservação, enquanto, em suspensão, as células ficam mais expostas ao choque térmico e mudanças na osmolaridade celular e do meio.

De um modo geral, os agentes crioprotetores utilizados bem como os tempos de equilíbrio e as taxas de congelamento, que têm um papel definitivo no sucesso da criopreservação, parecem estar bem definidos para determinadas espécies. Porém, o maior problema ainda recai sobre a análise da integridade e a viabilidade celular. A correlação positiva encontrada entre a técnica de coloração de eosina-nigrosina e a citometria de fluxo indicam a possibilidade de utilizar ambas as técnicas de forma complementar, porém, alguns ajustes metodológicos ainda precisam ser levados em consideração, ajustes esses que vão desde o tempo hábil para aperfeiçoar as condições de um citômetro de fluxo, até o tempo de exposição das amostras a temperatura ambiente e coloração. De fato, a manipulação de muitas amostras concomitantemente dificulta a execução de cada um dos passos em seu tempo ótimo, o que certamente gera resultados muito variáveis dentre os estudos de criopreservação.

Por fim, cabe ressaltar que o sucesso limitado observado em reproduções de muitas espécies de peneídeos em cativeiro pode estar relacionado com problemas reprodutivos em machos (Jar, 2005), pois grande parte destes estudos com camarões são direcionados às fêmeas,

fazendo-se necessário o desenvolvimento de estudos referentes à produção de espermatozoides e à qualidade espermática (Nimrat et al., 2005) bem como das biotecnologias de avaliação da qualidade espermática.

## CONCLUSÕES

---

- a) Não foi observada diferença entre os dois crioprotetores testados, DMSO e EG sobre resultados de integridade celular.
- b) A viabilidade celular decaiu com o aumento do tempo de armazenamento em nitrogênio líquido.
- c) As técnicas de citometria de fluxo e coloração de eosina-nigrosina apresentaram alto grau de correlação, indicando que ambas podem ser utilizadas com bom grau de confiabilidade para analisar viabilidade celular espermática. Devido ao custo consideravelmente inferior da técnica de eosina-nigrosina, esta ainda parece apresentar-se como uma técnica mais vantajosa para o fim proposto neste trabalho.

## REFERÊNCIAS DO ARTIGO

---

Akarasanon K., Damrongphol, P., Poolsanguan, W. (2004) Long-term cryopreservation of the spermatophore of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture research* **35**, 1415-1420.

Alfaro, J. Komen, J., Huisman, E. A. (2001) Cooling, cryoprotectant and hypersaline sensitivity of penaeid shrimp embryos and nauplius larvae. *Aquaculture* **195**, 353-366.

Anchordoguy T., Crowe J. H., Griffin F. J, Clark W. H. (1988) Cryopreservation of sperm from the marine shrimp *Sicyonia ingentis*. *Cryobiology* **25**(3), 238-243.

Aye M., Giorgio C. Di., Mo M. De., Botta A., Perrin J., Courbiere B. (2010) Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. *Food and Chemical Toxicology* **48**, 1905-1912.

- Barth, A.N.; Choosuk, S.; Thakur, D.P.(2006) Spermatophore cryopreservation and artificial insemination of black tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture Research* **37**, 523-528.
- Bhavanishankar, S., Subramoniam, T. Cryopreservation of spermatozoa of the edible mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) (1997) *Journal of Experimental Zoology* **277**, 326–336,.
- Billard, R., Cosson J., Noveiri, S. B., Pourkazemi, M. (2004) Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. *Aquaculture* **236**, 1-9,.
- Cabrita, E., Martínez, F., Alvarez, M., Herraiz M. P. (2001) The use of Flow Cytometry to assess membrane stability in fresh and cryopreserved trout spermatozoa. *Cryo Letters* **22**, 263–272.
- Castro, S.V; Carvalho, A.A.; Silva, C.M.G., Rocha L. F., Figueiredo, J. R., Rodrigues, A. P. R. (2011) Intracellular Cryoprotant Agents: Characteristics and Use of Ovarian Tissue and Oocyte Cryopreservation. *Acta Scientiae Veterinariae* **39**(2), 957.
- Chow , S. Tam Y., Ogasawara, Y. (1985) Cryopreservation of the spermatophore of the fresh water shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. *Biology Bulletin* **168**, 471-475.
- Fahy, G.M. (2010) Cryoprotectant toxicity neutralization. *Cryobiology* **60**, 45-53.
- FAO (Food and Agriculture Organization). The state of world fisheries and aquaculture 2010. Fisheries and Aquaculture Department **FAO**, 2010. Rome. 218 pp.
- Gwo, J-C. Cryopreservations of aquatic invertebrate semen: a review. *Aquaculture Research* **31**, 259-271.
- Jeyalectumie, C.; Subramoniam, T. (1989) Cryopreservation of spermatophores and seminal plasma of the edible crab *Scylla serrata*. *Biological Bulletin* **177**, 247-253.
- Legendre, M.; Linhart, O.; Billard, R. (1996) Spawning and management of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei. *Aquatic Living Resources* **9**, 59-80.

Lezcano, M. Granja, C., Salazar, M. (2004) The use of flow cytometry in the evaluation of cell viability of cryopreserved sperm of the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Cryobiology* **48**, 349-356.

Morris, J. (2007) *Asymptote Guide to Cryopreservation*. 2ed. Cambridge: Ed. Asymptote Ltda.. 43p.

Nakayama, C. Peixoto, S., Lopes, D., Vita, G., Krummenauer, D., Foes, G., Cavalli, R., Wasielesky, W. (2008) Métodos de extrusão manual e elétrica dos espermatóforos de reprodutores selvagens do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda: Penaeidae). *Ciência Rural* **38**(7), 2018-2022.

Nimrat, S., Sangnawakij, T. Vuthiphandchai, V. (2005) Preservation of Black Tiger shrimp *Penaeus monodon* spermatophores by chilled storage. *Journal Of The Aquaculture Society* **36**(1) 76-86.

Salazar, M.; Lezcano, M.; Granja, C. (2008) Protocol for cryopreservation of *Penaeus vannamei* sperm cells. (In Cabrita, E.; Robles, V.; Herráez, P., *Methods In Reproductive Aquaculture. Marine and Freshwater Species*. Boca raton: Ed. CRC Press, 2008, 508 p.

Scott, A.P.; Baynes, S.M. (1980) A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *Journal of Fish Biology* **17**, 707-739.

Vuthiphandchai, V., Nimrat, S., Kotcharat, S., Bart, A. N. (2007) Development of a cryopreservation protocol for long-term storage of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatophores. *Theriogenology* **68**, 1192-1199.

Zampolla, T., Spikings E., Zhang T., Rawson D.M. (2009) Effect of methanol and ME2SO exposure on mitochondrial activity and distribution in stage III ovarian follicles of zebrafish (*Danio rerio*). *Cryobiology* **59**, 188-194.

Zar, J. H. **Biostatistical Analysis**. 5 ed. Nova Iorque: Ed. Prentice-Hall, 2004.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

Os estudos acerca da criopreservação de sêmen de crustáceos são poucos. Dentre os mais recentes, a variabilidade entre os resultados de citometria de fluxo pode ser atribuída não só às diferenças na preparação das amostras, mas também ao fato de que pesquisadores de espécies aquáticas normalmente têm limitações para obter experiências significativas para operar os citômetros de fluxo, e acabam por depender da experiência de pesquisadores de mamíferos – que geralmente possuem experiência mínima com amostras de animais não-mamíferos. Uma abordagem padronizada para avaliação da qualidade espermática de animais aquáticos é imprescindível para pesquisa e eventuais aplicações industriais (Leibo, 2011), pois há um conjunto de variáveis capazes de afetar a qualidade e efetividade das análises citométricas, e todas precisam ser levadas em consideração para permitir precisão e reprodutibilidade dos resultados.

Por fim, entende-se que o sucesso dessa técnica depende de uma delicada e complexa interação entre importantes variáveis, principalmente no que diz respeito a verificação da viabilidade celular que ainda precisam ser exploradas e dominadas a fim de gerar um protocolo confiável para a espécie *L. vannameii*.

## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

---

ADAMS, S.L., HESSIAN, P.A., MLADENOV, P.V. Flow cytometric evaluation of mitochondrial function and membrane integrity of marine invertebrate sperm. **Invertebrate Reproduction and Development**, v. 44, p. 45–51, 2003.

AKARASANON K.; DAMRONGPHOL, P.; POOLSANGUAN, W. Long-term cryopreservation of the spermatophore of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). **Aquaculture research**, v. 35, p. 1415-1420, 2004.

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

ANCHORDOGUY, D.E. et al. Cryopreservation of sperm from the marine shrimp *Sicyonia ingentis*. **Cryobiology**, Davis, v. 25, n. 3, p. 238-243, 1988.

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

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

BILLARD, R.J. et al. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. **Aquaculture**, v.236, p.1-9, 2004.

CARNEIRO, P.C.F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.361-366, 2007.

CAROSFELD, J. et al. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, v. 63, p. 472-489, 2003.

CASTRO, S.V. et al. Intracellular Cryoprotant Agents: Characteristics and Use of Ovarian Tissue and Oocyte Cryopreservation. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n.2, p. 957, 2011

CHAVES, T.C.B. **Avaliação de técnicas de criopreservação de sêmen do camarão branco, *Litopenaeus shmitti* (Crustácea, Dendrobranchiata, Penaeidae)**. 2010. 42 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Zootecnia, UFFRJ, 2010.

CHOW, S. Artificial insemination using preserved spermatophores in the palaemonid shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. **Bulletin of the Japanese Society of scientific fisheries**, v.48 , n.12 , p.1693-1695, 1982 .

CHOW , S. et al. Cryopreservation of the spermatophore of the fresh water shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. **Biology Bulletin**, v. 168, n. 368, p. 471-475, 1985.

CLARK ,W. H. et al. In vitro fertilization with non-motile spermatozoa of the brown shrimp *Penaeus aztecus*. **Marine Biology**, v. 22, p . 353-354, 1973 .

De BAULNY, B. et al. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. **Cryobiology**, v. 34, p.141–149, 1997.

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

DOUGHERTY, W.J., DOUGHERTY, M.M., 1989. Electron microscopical and histochemical observations on melanized sperm and spermatophores of pond-cultured shrimp, *Penaeus vannamei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 54, p. 331–343, 1989.

DUMONT P. et al. Freezing of sperm ball of the marine shrimp *Penaeus vannamei*. In: Workshop on Gamete and Embryo Storage and Cryopreservation in Aquatic Organisms, 1992, Marly Le Roi. **Anais...** Marly Le Roi, França: Directorare for Fisheries, 1992.FRIEDLER S., GIUDICE L.C., LAMB E.J. Cryopreservations of embryo and ova. **Fertility and Sterility**, v. 49, p. 763-764, 1988.

GOLDBERG, R. S. **Comparação da eficiência da eletroejaculação entre tipos morfológicos de macho e manejos de criopreservação espermática do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii***. 1998. 41 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Zootecnia, Departamento de Produção Animal, UFRRJ, Seropédica, 1998.

GRIFFIN, F.J. et al. Intracellular pH decrease during the in vitro induction of the acrosome reaction in the sperm of *Sicyonia ingentis*. **Biology Bulletin**, v. 173, p. 311–323, 1987.

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

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

JAIN, K.J; PAULSON, R.J. Oocyte cryopreservation. **Fertility and Sterility**. n. 86, v. 3, p.1037-1046, 2006.

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

LANNAN, J. E. 1971. Experimental self-fertilization of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, utilizing cryopreserved sperm. **Genetics**, v. 68, p. 599–601.

LEGENDRE, M.; LINHART, O.; BILLARD, R. Spawning and management of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei. **Aquatic Living Resources**, v.9, p.59-80, 1996.

LEUNG-TRUJILLO, J., LAWRENCE, A.L.. Observations on the decline in sperm quality of *Panaeus setiferus* under laboratory conditions. **Aquaculture**, v. 65, p. 363–370, 1987.

LEIBO, S.P.; BRADLEY, L.1999. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: **The Male Gamete**. C. Gagnon, Ed. Cache River Press, Vienna, IL. pp. 502-515

LEIBO, S.P.; POOL, T.B. The principal variables of cryopreservation: solutions, temperatures, and rate changes. **Fertility and Sterility**, n. 2, v. 96, 2011.



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

MARIA, A. N. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2005. 71 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MARTINEZ-PASTOR et al. Probes and Techniques for Sperm Evaluation by Flow Cytometry. **Reproduction in domestic animals**, v. 45, p. 67-78, 2010.

MORAES, G. F. **Resfriamento e congelamento do sêmen de piau-açu *Leporinus macrocephalus***. 2004. 68p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Zootecnia, UFLA, Lavras, 2004.

NAKAYAMA, C., et al. Métodos de extrusão manual e elétrica dos espermatóforos de reprodutores selvagens do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda: Penaeidae). **Ciência Rural**, v.38, n.7, p.2018-2022, 2008.

NIMRAT, S et al. Chilled storage of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) spermatophores. **Aquaculture**, v. 261, p. 944–951, 2006.

PANIAGUA-CHÁVEZ et al. Assessment of gamete quality for the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) by use of Fluorescent dyes. **Cryobiology**, v. 53, p. 128–138, 2006.

PASCUAL, C. et al. Effect of water temperature on reproductive tract condition of *Penaeus setiferus* adult males. **Journal of Aquaculture Society**, v.4, n.29, p. 477-484, 1998.

ROSAS, C. et al. The effect of electrical stimulation on spermatophore regeneration in white shrimp *Penaeus setiferus*. **Aquatic Living Resources**, v.6, p.139-144, 1993.

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

SANDIFER, P.A e SMITH, T.I.J. A method for artificial insemination of *Macrobrachium* prawns and it's potential use in inheritance and hybridization studies. **World Mariculture Society**, v. 10, p. 403-418, 1980.

SCOTT, A.P.; BAYNES, S.M. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. **Journal of Fish Biology**,v.17, p.707-739, 1980.

SEGOVIA, M. et al. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. **Theriogenology**, v. 53, p.1489–1499, 2000.

SILVA, T. L. et al. Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos. **Boletim de Biotecnologia**, v.77, p.32-40, 2004.

TIERSCH, T. R.; GREEN, C. C. **Cryopreservation in Aquatic Species**. 2 ed. Louisiana: Ed. World Aquaculture Society, Baton Rouge. 2011.1003 p.

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

VUTHIPHANDCHAI, V. et al. Development of a cryopreservation protocol for long-term storage of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, p. 1192-1199, 2007.

WANG, O. et al. Spermatozoa preservation under normal temperature and the effects of artificial insemination of *Penaeus chinensis*. **Journal of Fishery Sciences of China**, v.2, n. 1, p. 47-54, 1989.

WILDT, D.E. et al. Genome Resource Banks. **BioScience**, n. 10, v. 47, p. 689- 698, 1997.

WOODS E.J. et al.. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. **Cryobiology** , v 48, p. 146–56, 2004.

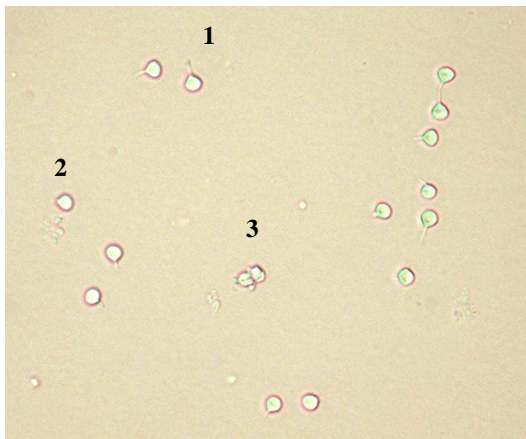
## ANEXOS

---

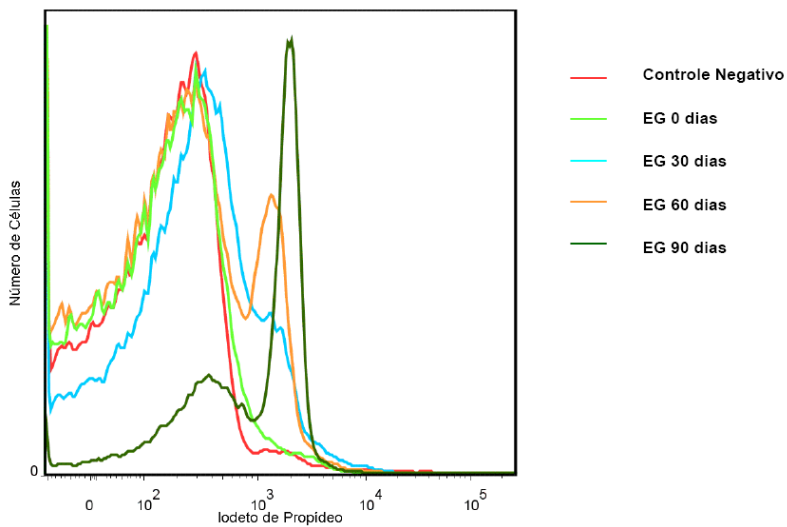
Anexo 1. Espermatóforo maduro de *Litopenaeus vannamei*.



Anexo 2. Células espermáticas de *L. vannamei* submetidas a teste de toxicidade dos crioprotetores DMSO e EG. Células com a presença de espinho (1) são consideradas íntegras, e células sem espinho (2) e evertidas (3) são consideradas não íntegras ou inviáveis.



Anexo 3. Resultado das análises de citometria de fluxo em células espermáticas de *Litopenaeus vannamei* criopreservadas com EG e DMSO.



+

