

## Métodos de extrusão manual e elétrica dos espermatóforos de reprodutores selvagens do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda: Penaeidae)

### Manual and electrical spermatophore extrusion methods of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda: Penaeidae) wild broodstock

Cintia Nakayama<sup>I</sup> Silvio Peixoto<sup>II</sup> Diogo Lopes<sup>III</sup> Gustavo Vita<sup>III</sup> Dariano Krummenauer<sup>III</sup>  
Geraldo Foes<sup>III</sup> Ronaldo Cavalli<sup>III</sup> Wilson Wasielesky<sup>IV</sup>

#### RESUMO

O presente estudo comparou os métodos manual e elétrico de extrusão do espermatóforo do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* com o objetivo de verificar se os métodos de extrusão exercem influência na quantidade de células espermáticas e na regeneração de novos espermatóforos. Os machos foram extrusados no início (dia zero) e no final do experimento (dia 43) para verificação da eficiência dos métodos no processo de regeneração. A extrusão manual foi realizada por meio de pressão na região do quinto par de pereiópodos e o método elétrico com uso de eletrodo para transmissão de impulso elétrico de 9 volts na mesma região. Os dois métodos foram considerados eficientes, não sendo encontradas diferenças significativas entre estes ( $P > 0,05$ ) para o número de células espermáticas. Entretanto, foi verificada, no final do experimento, a perda de peso corporal, peso de espermatóforo e menor índice espermatossomático (IES) ( $P < 0,05$ ) nos animais submetidos a extrusão do espermatóforo por estímulo elétrico. Os valores médios finais ( $\pm DP$ ) do número de espermatozoides foram 1,46 ( $\pm 0,84$ ) e 3,25 milhões ( $\pm 2,12$ ) para os tratamentos com método elétrico e manual, respectivamente. Os resultados indicam que ambos os métodos podem ser utilizados para a coleta inicial de espermatóforos e testes de qualidade de espermatozói-de. Entretanto, para a reutilização dos machos após a extrusão inicial do espermatóforo, o método manual é mais indicado pela manutenção do número de células espermáticas, peso do espermatóforo, peso corporal e índice espermatossomático após a regeneração.

**Palavras-chave:** camarão-rosa, espermatóforo, extrusão, inseminação artificial, macho.

#### ABSTRACT

The present study compared manual and electrical methods to extrude the spermatophore of the pink shrimp

*Farfantepenaeus paulensis* aiming to analyze their influence on the number of spermatid cells and spermatophore regeneration. The males were extruded in the beginning (day zero) and in the end (43<sup>rd</sup> day) of the experiment to evaluate the efficiency of these methods in the regeneration process. For the extrusion, a gentle pressure was applied manually in the fifth pair of pereopods or electrically by a 9 volt pulse in the same area. Both methods were efficient in removing the spermatophore and no significant differences were found ( $P > 0.05$ ) in the number of sperm cells. Nevertheless, significant decreases ( $P < 0.05$ ) in the body weight, spermatophore weight and spermatosomal index (ESI) at the end of the experimental period were observed by using the electrical stimulation. The mean values ( $\pm SD$ ) of the number of sperm cells were 1.46 ( $\pm 0.84$ ) and 3.25 ( $\pm 2.12$ ) millions for the electrical and manual treatments, respectively. Results indicate that both methods may be applied to collect initial samples of spermatophores as well as for sperm quality testing. However, when previously spermatophore-extruded males are to be used, the manual method is indicated as the number of spermatid cells, spermatophore weight, body weight, and ESI are maintained after regeneration.

**Key words:** pink shrimp, spermatophore, extrusion, artificial insemination, male.

#### INTRODUÇÃO

O camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* é uma espécie nativa do litoral brasileiro, encontrada desde o sul da Bahia ao sul do Rio Grande do Sul (D'INCAO et al., 2002). Na Lagoa dos Patos (RS) a

<sup>I</sup>Programa de Pós-graduação em Aqüicultura, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil. E-mail: cintianakayama@yahoo.com.br. Autor para correspondência.

<sup>II</sup>Departamento de Pesca e Aqüicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil.

<sup>III</sup>FURG, Rio Grande, RS, Brasil.

<sup>IV</sup>Departamento de Oceanografia, FURG, Rio Grande, RS, Brasil.

captura do camarão-rosa é a principal fonte de renda para a população de pescadores artesanais, os quais também vêm sendo beneficiados com a criação da espécie em estruturas alternativas (cercados e gaiolas) e viveiros nesta região (WASIELESKY et al., 2002, PEIXOTO et al., 2003; PRETO et al., 2005, KRUMMENAUER et al., 2006).

Embora a produção em cativeiro de pós-larvas de *F. paulensis* seja uma realidade, freqüentemente ocorre diminuição na taxa de fertilização dos ovos, atribuídas à ausência de cópula nos tanques de maturação, resultando em perdas na produção (PEIXOTO et al., 2004a). Este problema, que também já foi observado para outras espécies de peneídeos (BEARD & WICKINS, 1980; LIN & TING, 1986; PEETERS & DITER, 1994), pode ser contornado com a utilização de inseminação artificial, possibilitando resultados similares à cópula natural em *F. paulensis* (PETERSEN et al., 1996; PEIXOTO et al., 2004a). Em peneídeos de tético fechado, como *F. paulensis*, a inseminação das fêmeas deve ser feita logo após a muda, quando o exoesqueleto ainda está mole, bem como as placas que compõem o tético, facilitando a implantação do espermatozóide obtido de machos no período de intermuda no receptáculo seminal sem causar nenhum dano à fêmea (LIN & TING, 1986). Entretanto, a qualidade dos espermatozóides deve ser considerada por ser um fator decisivo para o sucesso da inseminação artificial, sendo também utilizada como um dos critérios de seleção de reprodutores por meio da contagem do número de células espermáticas, do percentual de células vivas e da morfologia dos espermatozóides (LEUNG-TRUJILLO et al., 1985, CEBALLOS-VAZQUEZ et al., 2003).

Para a obtenção dos espermatozóides, são utilizados dois métodos de extrusão, um manual por meio de uma leve pressão na coxa do quinto par de pereiópodos (PETERSEN et al., 1996), e outro elétrico com a aplicação de um leve choque nesta mesma região (PRATOOMCHAT et al., 1993). O método manual tem a vantagem de ser aplicado mais diretamente no ponto de extrusão do espermatozóide, porém, depende da habilidade do operador para diminuir o tempo de manipulação do organismo durante este processo. Já o método elétrico é mais rápido e independe da experiência do operador, mas pode causar estresse pela passagem da corrente elétrica por todo o corpo do animal. Entretanto, ambos os métodos de extrusão do espermatozóide podem causar injúrias ao aparelho reprodutor dos machos, levando a um processo de melanização que pode ocasionar a diminuição do número de células espermáticas em novos espermatozóides (PASCUAL et al., 1998; ALFARO, 1993).

O presente estudo avaliou os efeitos de dois métodos de extrusão de espermatozóide (manual e elétrico) sobre a quantidade de espermatozóides e a regeneração dos espermatozóides, visando um melhor aproveitamento de reprodutores de *F. paulensis* para inseminação artificial.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Manejo de machos reprodutores

Os camarões machos utilizados neste experimento foram provenientes da pesca industrial do litoral Santa Catarina, entre os municípios de Imbituba e Florianópolis, (28°10'51"S e 48°34'09"W). Estes animais foram trazidos à Estação Marinha de Aquicultura da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (EMA - FURG) e devidamente aclimatados em um tanque de maturação (10.000L) por um período de sete dias em densidade de 13 animais m<sup>-2</sup>. Neste tanque foi mantida uma temperatura média da água de 24°C (±0,6), aeração constante e com fotoperíodo de 14 horas de luminosidade. A alimentação foi oferecida, de forma alternada, quatro vezes ao dia com alimento fresco (lula *Illex argentinus*, siri *Callinectes* spp e músculo de peixe *Macrodon ancylodon*) e ração comercial de maturação (Breed S Inve®, Bélgica).

### Experimento de extrusão do espermatozóide

Após a aclimação, os camarões (n=30) foram divididos aleatoriamente em dois grupos de 15 camarões cada, mantidos em tanques circulares de 1.000L com aeração constante e manejo semelhante ao descrito para o tanque de maturação. Cada um destes grupos de camarões correspondeu a um dos tratamentos com utilização da técnica manual e elétrica de extrusão do espermatozóide. Foram realizadas duas extrusões por animal em cada grupo, sendo a primeira no início do experimento (dia zero) e a segunda no final do experimento (dia 43), ou seja, separadas por um intervalo de 43 dias. No método manual, os espermatozóides foram expelidos pela compressão da região latero-ventral posterior à inserção do quinto par de pereiópodos em machos no período de intermuda (LIN & TING, 1986). O estímulo elétrico foi produzido por meio da colocação de dois eletrodos na mesma região, ligados a uma fonte de energia de 9V (GOLDBERG & OSHIRO, 2000). Inicialmente, cada camarão foi pesado e uma marcação individual foi realizada por meio de cortes nos urópodos, permitindo a identificação individual dos animais.

Os espermatozóides extraídos, tanto no início (dia zero) como no final (dia 43) do experimento, foram pesados e os espermatozóides contados no microscópio

óptico com o auxílio de um hemacitômetro (câmara de Neubauer), de acordo com o método proposto por LEUNG-TRUJILLO & LAWRENCE (1987b).

Para o cálculo do índice espermatoossomático (IES), foi utilizada a seguinte fórmula:  $IES = (\text{peso do espermátóforo/peso corporal}) \times 100$

A sobrevivência dos animais foi observada duas, 24, 48 e 72 horas após a extrusão dos espermátóforos em ambos os métodos. Após 72 horas, também foi realizado um exame visual na região de inserção do quinto par de pereiópodos para verificar a ocorrência de melanização.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) fatorial de duas vias, seguido do teste post-hoc de Tukey com 5% de significância.

## RESULTADOS

Os valores do número de células espermáticas, peso corporal, peso dos espermátóforos e índice espermatoossomático são apresentados na tabela 1. Em relação ao número de células espermáticas, independentemente do tipo de extrusão e momento da extrusão (dia zero ou 43), não foram encontradas diferenças significativas. Entretanto, foi observada uma tendência de diminuição no número de espermatozoides produzidos em espermátóforos extraídos com estímulo elétrico no final do experimento (dia 43).

O peso corporal apresentou uma redução significativa entre o início e o fim do experimento, quando o método elétrico foi utilizado, porém, não foram observadas diferenças significativas se forem comparados separadamente os pesos iniciais e finais

dos camarões submetidos aos dois métodos de extrusão (Tabela 1). O peso inicial e final do espermátóforo também sofreu uma redução significativa em machos tratados com estímulo elétrico, mas, nesse caso, os valores finais foram inferiores significativamente em relação ao método de extrusão manual (Tabela 1). Os valores de IES acompanharam as diferenças encontradas para peso do espermátóforo entre os tratamentos.

Independentemente do tratamento utilizado, nenhum animal apresentou melanização na região interna ao aparelho reprodutor durante as 72 horas iniciais do experimento. Em geral, esses danos (melanização) são observados a partir de 24 horas, devido ao manuseio. Somente ao final do experimento um macho de cada tratamento apresentou melanização no aparelho reprodutor. Em relação às mortes, duas horas após a aplicação do método elétrico apenas um indivíduo foi encontrado morto e, após 24 horas, foi registrada a morte de um macho de cada tratamento. Nas amostras subsequentes (48 e 72 horas), não foi encontrado nenhum outro animal morto. A sobrevivência final foi de 93,3% e de 86,7% para os métodos de extrusão manual e elétrico, respectivamente.

## DISCUSSÃO

A utilização do método de extrusão manual do espermátóforo implica pressão mecânica pontual na região do quinto par de pereiópodos, dependendo muitas vezes da experiência do operador em extrair os espermátóforos e minimizar possíveis danos causados ao animal. Por outro lado, o estímulo elétrico aplicado

Tabela 1 - Valores médios ( $\pm$ DP) de peso corporal, peso do espermátóforo, número de células espermáticas e índice espermatoossomático (IES) de machos de *Farfantepenaeus paulensis* submetidos aos métodos de extrusão manual e elétrica dos espermátóforos no início (dia 0) e final (dia 43) do período experimental. Número amostral (n) encontra-se entre parênteses.

	Dia da extrusão	Elétrico	Manual
Peso corporal (g)	0	25,28 $\pm$ 1,92 (n=15)	24,64 $\pm$ 2,44 (n=15)
	43	22,21 $\pm$ 1,45 * (n=13)	23,15 $\pm$ 1,68 (n=14)
Peso espermátóforo (g)	0	0,018 $\pm$ 0,004 (n=15)	0,018 $\pm$ 0,003 (n=15)
	43	0,008 $\pm$ 0,002 ** (n=13)	0,014 $\pm$ 0,004 (n=14)
Número de células espermáticas	0	2,43 $\pm$ 1,19 (n=15)	3,57 $\pm$ 2,45 (n=15)
	43	1,46 $\pm$ 0,84 (n=13)	3,25 $\pm$ 2,12 (n=14)
IES	0	0,071 $\pm$ 0,014 (n=15)	0,072 $\pm$ 0,011 (n=15)
	43	0,037 $\pm$ 0,011 ** (n = 13)	0,058 $\pm$ 0,016 (n=14)

\* Indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ) intra-tratamento.

\*\* Indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ) intra- e inter-tratamento.

na mesma região faz com que a corrente elétrica seja distribuída por todo o corpo do animal, independentemente de quem opera os eletrodos. A redução do peso corporal dos animais submetidos à extrusão elétrica observada nesse estudo pode estar relacionada ao estresse fisiológico gerado por esta técnica. Juntamente com as observações de redução do peso do espermatóforo e a tendência de diminuição do número de células espermáticas nos espermatóforos, parecem sugerir possíveis danos causados pelo impulso elétrico ao aparelho reprodutor (testículos, vasos deferentes e ampolas terminais). Entretanto, a voltagem utilizada no presente estudo está de acordo com as recomendações para uso de eletrochoque como estímulo para a extrusão de espermatóforo em *Penaeus monodon* (PRATOOMCHAT et al., 1993). Outros trabalhos também relacionaram a diminuição do número de células a outros fatores independentes do processo de extrusão, tais como nutricionais, degeneração do trato reprodutivo e permanência dos reprodutores selvagens em cativeiro (ALFARO, 1993; LEUNG-TRUJILLO & LAWRENCE, 1987a).

O número de espermatozoides por unidade de espermatóforo pode variar conforme a espécie, a idade, o peso e o estágio de maturação do camarão (DÍAZ et al., 2001; ALFARO 1993). COSTA & NASCIMENTO (1993), utilizando machos de *F. paulensis* obtidos em fazendas de engorda, encontraram valores de 5 mil a 37 milhões de espermatozoides por unidade de espermatóforo, em camarões com peso corporal variando entre 4g e 30g. A variação encontrada por estes autores pode ser atribuída especialmente às diferentes classes de peso dos animais estudados. Em *Litopenaeus stylirostris* (ALFARO, 1993) e *Pleoticus muelleri* (DÍAZ et al., 2001) com peso entre 20g-30g foram observadas, respectivamente, médias de 1,6 milhões e 4,7 milhões de células espermáticas por unidade de espermatóforo indicando que diferenças entre o número de células dependem também da espécie. Os valores médios do presente estudo em relação ao número de espermatozoides (2,68 milhões de células) e peso do espermatóforo (0,01g) estão de acordo com o trabalho de PEIXOTO et al. (2004b) para *F. paulensis* criados em cativeiro com classe de tamanho semelhante. Estes autores sugeriram que diferenças significativas no peso do espermatóforo entre diferentes classes de tamanho não estão necessariamente relacionadas com o número de células espermáticas, mas com os componentes estruturais do espermatóforo.

O tempo de regeneração do espermatóforo pode variar conforme a espécie, com valores médios de quatro, seis e sete dias, respectivamente para *L.*

*vannamei*, *L. stylirostris* e *P. setiferus* (LEUNG-TRUJILLO & LAWRENCE, 1987b). GIANGIOBBE et al. (1996) realizaram a extrusão do espermatóforo manual e eletricamente em *F. paulensis* e verificaram que o tempo de regeneração foi em média de 11 dias com uso de estímulo elétrico e nove dias com extrusão manual. No entanto, este período parece sofrer variação conforme a temperatura da água (PASCUAL et al., 1998). Embora a análise do tempo de regeneração não tenha sido a proposta deste estudo, considera-se que o número de dias definido para realização da segunda extrusão do espermatóforo foi suficiente para sua regeneração completa e comparação entre os métodos empregados.

Quanto ao processo de melanização que pode ocorrer em espermatóforos regenerados, apenas um caso em cada tratamento foi observado e nenhum apresentou coloração totalmente escura indicadora de espermatóforo completamente melanizado e comprometido (LEUNG-TRUJILLO & LAWRENCE, 1987b).

## CONCLUSÃO

Os resultados encontrados na extrusão de espermatóforos de *F. paulensis* por meio dos métodos elétrico e manual indicaram que ambos podem ser utilizados para a coleta inicial de espermatóforos para inseminação artificial e teste de qualidade de espermatozoide. No entanto, a análise estatística permite concluir que, para a reutilização dos machos após a extrusão inicial do espermatóforo, o método manual é mais indicado pela manutenção do número de células espermáticas, peso do espermatóforo, peso corporal e índice espermatossomático após a regeneração.

## REFERÊNCIAS

- ALFARO, J. Reproductive quality evaluation of male *Penaeus stylirostris* from a grow-out pond. *Journal of the World Aquaculture Society*, v.24, p.6-11, 1993.
- BEARD, T.W.; WICKINS, J.F. Breeding of *Penaeus monodon* Fabricius in laboratory recirculation systems. *Aquaculture*, v.20, p.79-89, 1980.
- CEBALLOS-VAZQUEZ, B.P. et al. Sperm quality in relation to age and weight of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, v.228, p.141-151, 2003.
- COSTA, S.; NASCIMENTO, P. The number of spermatozoa per spermatophore in *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967 (Crustacea, Decapoda, Penaeidea). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE CULTIVO DE CAMARÃO, 4., 1993, João Pessoa. *Anais...* João Pessoa: MRC Aquacultura, 1993. V.1, p.498-519.

- DÍAZ, A.C. et al. Reproductive performance of male argentine red shrimp *Pleoticus muelleri* Bate (Decapoda, Penaeoidea) in culture conditions. **Journal of the Aquaculture Society**, v.32, n.2, p.236-241, 2001.
- D'INCAO, F. et al. Avaliação da pesca de camarões nas regiões Sudeste e Sul do Brasil. **Atlântica**, v.20, p.103-116, 2002.
- GIANGIOBBE, M.A. et al. Efecto de la stimulation electrica y extrusion manual en la regeneration del espermatóforos en el camarón rosa *Penaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE ACUICULTURA, 9., 1996, Coquimbo. **Anais...** Chile, 1996. p.54.
- GOLDBERG, R.S., OSHIRO, L.M.Y. Eficiência da eletroejaculação de morfotipos machos do camarão-de-água-doce *Macrobrachium rosenbergii*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.1, p.1-5, 2000.
- KRUMMENAUER, D. et al. Viabilidade do cultivo do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea: Decapoda) em gaiolas sob diferentes densidades durante o outono no sul do Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.1, p.252-257, 2006.
- LEUNG-TRUJILLO, J.R.; LAWRENCE, A.L. The effect of eyestalk ablation on spermatophore and sperm quality in *Penaeus vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.16, p.258-266, 1985.
- LEUNG-TRUJILLO, J.R.; LAWRENCE, A.L. Spermatophore generation times in *Penaeus setiferus*, *P. vannamei*, and *P. stylirostris*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.22, n.4, p.244-251, 1987a.
- LEUNG-TRUJILLO, J.R.; LAWRENCE, A.L. Observations on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions. **Aquaculture**, v.65, p.363-370, 1987b.
- LIN, M.; TING, Y. Spermatophore transplantation and artificial fertilization in Grass Shrimp. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v.52, p.585-589, 1986.
- PASCUAL, C. et al. Effect of water temperature on reproductive tract condition of *Penaeus setiferus* adult males. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.29, n.4, p.477-484, 1998.
- PEETERS, L.; DITER, A. Effects of impregnation on maturation, spawning, and ecdysis of female shrimp *Penaeus indicus*. **Journal of Experimental Zoology**, v.269, p.522-530, 1994.
- PEIXOTO, S. et al. The influence of water renewal rates on the reproductive and molting cycles of *Penaeus paulensis* in captivity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.46, p.281-286, 2003.
- PEIXOTO, S. et al. Influence of artificial insemination on the reproductive performance of *Farfantepenaeus paulensis* in conventional and unisex maturation systems. **Aquaculture**, v.230, p.197-204, 2004a.
- PEIXOTO, S. et al. Effects of age and size on reproductive performance of captive *Farfantepenaeus paulensis* broodstock. **Aquaculture**, v.238, p.173-182, 2004b.
- PETERSEN, R.L. et al. Inseminacion artificial en *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. **Revista de Investigaciones Marinas**, v.17, p.215-219, 1996.
- PRATOOMCHAT, B. et al. Sperm quality of pond-reared and wild-caught *Penaeus monodon* in Thailand. **Journal World Aquaculture Society**, v. 24, p.530-540, 1993.
- PRETO, A.L. et al. Efeito da densidade de estocagem sobre o filme e o desempenho de pós-larva do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* cultivadas em gaiolas. **Ciência Rural**, v.35, n.6, p.1417-1423, 2005.
- WASIELESKY, W. et al. Cultivo do camarão-rosa como alternativa de geração de renda. In: CALDERÓN, A.I; SAMPAIO, H. (Eds.). **Extensão universitária: ação comunitária em Universidades Brasileiras**. São Paulo, Brasil: Olho D'Água, 2002. p.17-27.