

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

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS E  
EVOLUTIVOS DOS ESPERMATOZOIDES E  
ESPERMATÓFOROS DE *Farfantepenaeus*  
*paulensis* E *Farfantepenaeus brasiliensis*  
(DECAPODA: DENDROBRANCHIATA)**

**ANDRÉ LUIZ BRAGA DE SOUZA**

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

Orientador: Prof. Dr. Wilson Wasielesky

**RIO GRANDE  
DEZEMBRO DE 2013**

*Em memória de Maluka*

## ÍNDICE

LISTA DE TABELAS .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vi
RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUÇÃO GERAL .....	3
ESTRUTURA DA TESE .....	7
OBJETIVOS .....	8
HIPÓTESES .....	9
CAPÍTULO 1 – EVOLUÇÃO DA MORFOLOGIA DE ESPERMATOZOIDES UNIESTRELADOS DE DECAPODA .....	10
INTRODUÇÃO .....	11
MATERIAL E MÉTODOS .....	13
RESULTADOS .....	15
DISCUSSÃO .....	19
CONCLUSÕES .....	25
CAPÍTULO 2 – EVIDÊNCIAS EVOLUTIVAS DA ULTRAESTRUTURA DO ESPERMATOZOIDE DE <i>Farfantepenaeus brasiliensis</i> NA LINHAGEM DE CAMARÕES SEMELHANTES À PENEÍDEOS (DECAPODA: PENAEOIDEA) .....	26
INTRODUÇÃO .....	27
MATERIAL E MÉTODOS .....	29
RESULTADOS .....	33
DISCUSSÃO .....	37
CONCLUSÕES .....	46
CAPÍTULO 3 – ULTRAESTRUTURA DA CAPACITAÇÃO DO ESPERMATOZOIDE DE <i>Farfantepenaeus paulensis</i> .....	47
INTRODUÇÃO .....	48
MATERIAL E MÉTODOS .....	49
RESULTADOS .....	50
DISCUSSÃO .....	52
CONCLUSÕES .....	55

CAPÍTULO 4 – REGENERAÇÃO DO ESPERMATÓFORO DE <i>Farfantepenaeus brasiliensis</i> E O EFEITO DA MUDA .....	56
INTRODUÇÃO .....	57
MATERIAL E MÉTODOS .....	60
RESULTADOS .....	64
DISCUSSÃO .....	68
CONCLUSÕES .....	72
CAPÍTULO 5 – MELANIZAÇÃO HEMOCÍTICA DO ESPERMATÓFORO DE <i>Farfantepenaeus brasiliensis</i> DECORRENTE DE SUCESSIVAS EXTRUSÕES MANUAIS .....	73
INTRODUÇÃO .....	74
MATERIAL E MÉTODOS .....	76
RESULTADOS .....	78
DISCUSSÃO .....	81
CONCLUSÕES .....	85
CONCLUSÕES GERAIS .....	86
LITERATURA CITADA .....	87

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1.1: Espécies consideradas no presente estudo e a morfometria de seus espermatozoides ..... 14

Tabela 1.2: Principais caracteres dos espermatozoides uniestrelados de Pleocyemata e Dendrobranchiata ..... 17

### Capítulo 2

Tabela 2.1: Caracteres dos espermatozoides considerados no presente estudo, sua polarização na linhagem de camarões semelhantes à peneídeos e códigos usados para elaborar a Tabela 2.2 ..... 31

Tabela 2.2: Distribuição dos caracteres dos espermatozoides nos camarões semelhantes à peneídeos e grupos externos ..... 32

### Capítulo 4

Tabela 4.1: Qualidade espermática de espermatóforos de *Farfantepenaeus brasiliensis* formados e parcialmente formados ..... 66

Tabela 4.2: Qualidade espermática de espermatóforos de *Farfantepenaeus brasiliensis* formados naturalmente e após a muda ..... 68

### Capítulo 5

Tabela 5.1: Número de espermatóforos melanizados de *Farfantepenaeus brasiliensis* usados nas análises de qualidade espermática e histológica nas extrusões 1, 2 e 3 ..... 77

Tabela 5.2: Sobrevivência e qualidade espermática de *Farfantepenaeus brasiliensis* após sucessivas extrusões ..... 78

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

- Figura 1.1: Diversidade de espermatozoides uniestrelados. (A-B) Espermatozoides em forma de taça invertida. (C-E) Espermatozoides esféricos. (F) Espermatozoide abaulado. (G) Espermatozoide alongado. (A) *Pandalopsis japonica* (modificado de Kim *et al.* 20003). (B) *Macrobrachium rosenbergii* (modificado de Lynn & Clark 1983b). (C) *Sicyonia ingentis* (modificado de Shigekawa & Clark 1986). (D) *Solenocera membranacea* (modificado de Medina *et al.* 2006b). (E) *Farfantepenaeus paulensis* (modificado de Braga *et al.* 2013b). (F) *Artemesia longinaris* (modificado de Scelzo & Medina 2003). (G) *Xiphopenaeus riveti* (modificado de Alfaro *et al.* 2003) ..... 16
- Figura 1.2: Evolução de espermatozoides uniestrelados de Decapoda. Evolução convergente entre Pleocyemata e Dendrobranchiata (\*); *Peisos* e Reptantia (\*\*); e Stenopodidea, *Sergestes* e Aristeidae (\*\*\*) ..... 18

### Capítulo 2

- Figura 2.1: Filogenia de Penaeoidea proposta por Ma *et al.* (2009). \*A família Trachypenaeidae proposta pelos autores exclui *Trachypenaeopsis* ..... 28
- Figura 2.2: Massa espermática contida no espermatóforo de *Farfantepenaeus brasiliensis*. (A-B) Densa massa espermática (me) embebida em uma matriz extracelular (ex), formando um molde de cada célula (setas). (C-D) Detalhe da massa espermática. (E) Detalhe do padrão externo dos espermatozoides (ez). (F) Divisão do espermatozoide em corpo principal (cp) e espinho (ep) ..... 34
- Figura 2.3: Ultraestrutura do espermatozoide de *Farfantepenaeus brasiliensis*. (A) espermatozoide dividido em corpo principal (cp) e espinho (ep), apresentando corpos densos (cd) embebidos na região pró-nuclear. (B) região acrossômica dividida em região subacrossômica (rs) e vesícula acrossômica (va), a qual é zoneada em capuz acrossômico (ca) e espinho. (C) Divisão do capuz acrossômico em duas regiões periféricas (p) e uma central (c), mostrando ainda o citoplasma (ct) circundando o pró-núcleo (pn). (D) Detalhe da região subacrossômica. (E) Grânulos (g) e filamentos (fm) no pró-núcleo e as membranas acumuladas (ma) no citoplasma. (F) Vesículas citoplasmáticas (vc). Barras: A, 1,1 µm; C, 0,6 µm; B, D, E e F, 0,4 µm ..... 35

Figura 2.4: Tipos conhecidos de reação acrossômica de camarões semelhantes à peneídeos. (A) Sicyoniidae. (B) Peneini. (Modificado de Braga <i>et al.</i> 2013a) .....	44
---	----

### Capítulo 3

Figura 3.1: Comparação da ultraestrutura de espermatozoides coletados da ampola terminal (A-C) e do tético (D-F) de <i>Farfantepenaeus paulensis</i> . ep: espinho; ct: citoplasma; ma: membranas acumuladas; vp: vesícula pequena; vg: vesícula grande; pn: pró-núcleo; g: grânulos; fm: filamentos; ca: capuz acrossômico; rs: região subacrossômica. Barras: A, B, 1,1 µm; C, 0,15 µm; D, 0,6 µm; E, F: 0,25 µm .....	51
--	----

### Capítulo 4

Figura 4.1: Sistema reprodutivo de machos de Penaeidae, mostrando a divisão em testículo e vaso deferente. LT: lóbulos do testículo; VDP: vaso deferente proximal; VDM: vaso deferente médio; VDD: vaso deferente distal; AT: ampola terminal. (Modificado de Dall <i>et al.</i> 1990) .....	57
--	----

Figura 4.2: Diversidade dos espermatóforos de Penaeidae. Os cortes correspondem a espermatóforos contidos nas ampolas terminais. (A) <i>Litopenaeus</i> . (B) <i>Farfantepenaeus</i> . a: “asa”; m: músculo; g: glândulas; vdp: porção terminal do vaso deferente proximal; e: epitélio; c: cutícula; ex: matriz extracelular; me: massa espermática; apd: apêndice; gp: gonoporo. Barras: A = 1 mm; B = 2 mm. (Modificado de Bauer 1991) .....	59
---	----

Figura 4.3: Regiões do gonoporo (setas brancas) e posterior à inserção do quinto par de pereópodes (setas pretas) de machos de <i>Farfantepenaeus brasiliensis</i> em diferentes estágios de regeneração do espermatóforo. (A) Macho com espermatóforo não formado. (B) Macho com espermatóforo parcialmente formado. (C) Macho com espermatóforo formado. Barras = 1 mm .....	65
--	----

Figura 4.4: Espermatóforos de <i>Farfantepenaeus brasiliensis</i> em diferentes estágios de regeneração. (A) Espermatóforo formado. (B) Espermatóforo parcialmente formado. Barra = 1 mm .....	66
--	----

Figura 4.5: Percentuais de cada estágio de regeneração do espermatóforo da população de machos de <i>Farfantepenaeus brasiliensis</i> selvagem estudada no presente estudo após a extrusão manual. Setas indicam dias em que mudas foram encontradas nos tanques .....	67
--	----

**Capítulo 5**

Figura 5.1: Massa espermática contida no espermatóforo melanizado de <i>Farfantepenaeus brasiliensis</i> , mostrando espermatozoides, em sua maioria, com deformidade do corpo principal e/ou ausência do espinho. Coloração H-E .....	79
Figura 5.2: Fotomicrografias de espermatóforos melanizados de <i>Farfantepenaeus brasiliensis</i> . (A) Infiltração hemocítica em torno do tecido conectivo. (B) Infiltração hemocítica no tecido conectivo. Coloração H-E .....	80
Figura 5.3: Fotomicrografia de um espermatóforo não melanizado de <i>Farfantepenaeus brasiliensis</i> coletado na extrusão 2, mostrando a ausência de hemócitos infiltrados no epitélio (e), tecido conectivo (tc) e no aglomerado celular (ac) que compõem a estrutura do espermatóforo. Coloração H-E .....	81



## RESUMO

Estruturas reprodutivas são importantes ferramentas para estudos morfológicos e evolutivos. Na presente tese, a ultraestrutura dos espermatozoides foi utilizada, em conjunto com hipóteses filogenéticas moleculares atualmente aceitas, para avaliar a evolução da morfologia em Decapoda (Capítulo 1) e na linhagem de camarões semelhantes à peneídeos (Capítulo 2). A principal conclusão obtida no Capítulo 1 foi que a condição uniestrelada de espermatozoides é resultante de evolução convergente entre Pleocyemata e Dendrobranchiata. No Capítulo 2, o espermatozoide de *Farfantepenaeus brasiliensis* foi investigado por microscopia eletrônica. Neste capítulo, foi possível concluir que o padrão apresentado pela espécie é congruente com o observado para Peneini, o qual provavelmente é o mais próximo daquele apresentado pelo ancestral comum exclusivo de camarões semelhantes à peneídeos. A capacitação do espermatozoide de *Farfantepenaeus paulensis* foi investigada no Capítulo 3, sendo demonstrado que as mudanças morfológicas do espermatozoide após estocagem no télico ocorrem principalmente no pró-núcleo e na região acrossômica. Nos Capítulos 4 e 5, o espermatóforo foi a estrutura reprodutiva investigada. No Capítulo 4, o processo de regeneração foi avaliado em *F. brasiliensis* por meio de três experimentos, sendo concluído que a regeneração é gradual, a menos que ocorra muda, a qual acelera a formação do espermatóforo. No Capítulo 5, foi avaliada a melanização do espermatóforo de *F. brasiliensis* por meio de um experimento. A melanização do espermatóforo de camarões geralmente é relacionada a patógenos, estresse ou degeneração natural. No entanto, neste estudo é demonstrado que a melanização pode ser resultante também de um processo inflamatório decorrente da extrusão manual.

**Palavras-chave:** Espermatozoides, Espermatóforos, Camarões rosa, Morfologia da reprodução, Evolução da morfologia.

## ABSTRACT

Reproductive structures are important tools for studies on morphology and evolution. In this Thesis, the spermatozoal ultrastructure was used associated with molecular phylogenetic hypotheses that are currently accepted to evaluate the evolution of morphology in Decapoda (Chapter 1) and in the penaeid-like lineage (Chapter 2). The main conclusion obtained in the Chapter 1 was that the unistellate condition of decapod spermatozoa is result of convergent evolution between Pleocyemata and Dendrobranchiata. In the Chapter 2, spermatozoal ultrastructure of *Farfantepenaeus brasiliensis* was investigated using electron microscopy. In this chapter, the main conclusion was that the spermatozoal pattern of *F. brasiliensis* is congruent with that observed in Peneini, which is most likely the closest pattern to that of the exclusive common ancestor of the penaeid-like lineage. Spermatozoal capacitation of *F. paulensis* was investigated in the Chapter 3, in which was reported that the morphological changes of spermatozoa primarily occur in nucleus and acrosomal region after stocking of spermatophore into the thelycum. In the Chapters 4 and 5, the spermatophore was the reproductive structure investigated. In the Chapter 4, regeneration was evaluated in *F. brasiliensis* via results of three experiments and the conclusion was that this process is gradual, unless that the molting occurs, which accelerates the formation of the new spermatophore. In the Chapter 5, melanization was investigated in *F. brasiliensis*. This process is usually related to pathogens, stress or natural degeneration. However, in the study was demonstrated that the melanization may be also triggered by an inflammatory process caused by manual extrusion method.

**Keywords:** Spermatozoa, Spermatophore, Pink shrimp, Morphology of reproduction, Evolution of morphology.

## INTRODUÇÃO GERAL

A reprodução é um processo compartilhado por todos os seres vivos e está intrinsecamente relacionada à evolução, pois o sucesso de um organismo depende de o mesmo se manter vivo por tempo suficiente para se reproduzir. O tipo sexuado é amplamente desempenhado entre os animais e é caracterizado pela separação (gametas) e recombinação (zigoto) do material genético. Este tipo de reprodução contribui decisivamente para a variabilidade genética das populações e seu sucesso no ambiente constantemente mutável (Brusca & Brusca 2003, Hickman *et al.* 2011).

Maturação sexual, produção de gametas, corte e cópula são exemplos de processos reprodutivos associados à reprodução sexuada (Brusca & Brusca 2003). A diversidade de formas e processos envolvidos neste tipo de reprodução representa um amplo campo para estudos morfológicos, evolutivos e filogenéticos. Por exemplo, o estudo da ultraestrutura dos espermatozoides tem sido aplicado em investigações filogenéticas em vários grupos de animais, como platelmintos (Hendelberg 1986), anelídeos (Jamieson 1984, Musco *et al.* 2008), queliceriformes (Klann *et al.* 2009), insetos (Lino-Neto & Dolder 2001), anfíbios (Selmi *et al.* 1997, Garda *et al.* 2002), répteis (Jamieson & Healy 1992, Vieira *et al.* 2007), peixes (Medina *et al.* 2003), etc.

Para a ordem Decapoda, as relações filogenéticas ainda são controversas (Scelzo & Medina 2004). No entanto, é amplamente aceito que Decapoda é subdividida nas subordens Dendrobranchiata e Pleocyemata (Brusca & Brusca 2003). Dendrobranchiata inclui apenas animais em forma de camarões e seria formada por duas superfamílias: Sergestoidea, a qual inclui as famílias Luciferidae e Sergestidae; e Penaeoidea, incluindo Aristeidae, Benthescymidae, Penaeidae, Sicyoniidae e Solenoceridae (Pérez-Farfante & Kensley 1997). Penaeoidea seria formada por duas linhagens evolutivas distintas: a de camarões semelhantes à aristeídeos, incluindo

Aristeidae, Benthescymidae e Solenoceridae; e de camarões semelhantes à peneídeos, incluindo Penaeidae e Sicyoniidae (Chu *et al.* 2009, Ma *et al.* 2009). A subordem Pleocyemata, por sua vez, é dividida em infra-ordens como Caridea e Stenopodidea que incluem camarões e outras cinco que incluem caranguejos, ermitões, lagostas, lagostins, corruptos, etc, que têm em comum a predominância do hábito demersal, formando o grupo Reptantia (Brusca & Brusca 2003, Shen *et al.* 2013).

O emprego da morfologia dos espermatozoides em estudos sobre as relações filogenéticas de Decapoda tem sido limitado pela falta de descrições da ultraestrutura dessas células para os grupos da ordem. Desta forma, as hipóteses atualmente aceitas sobre as relações filogenéticas baseadas principalmente em análises moleculares têm sido usadas em estudos morfológicos para investigar a evolução da ultraestrutura dos espermatozoides (Klaus & Brandis 2011, Braga *et al.* 2013a).

Outro campo de investigação de estudos das ultraestruturas de espermatozoides tem permitido o conhecimento da morfologia de processos reprodutivos como reação acrossômica, fertilização, espermatogênese e capacitação (Dall *et al.* 1990, Braga *et al.* 2013a). A capacitação do espermatozoide é o processo no qual a célula sofre mudanças iônicas, bioquímicas e morfológicas após um tempo em contato com o corpo da fêmea, adquirindo capacidade de fertilização. Esse processo ocorre tanto em invertebrados, como em vertebrados (Wikramanayake *et al.* 1992, Visconti *et al.* 1995, 1999). Em Decapoda, a capacitação é observada até mesmo em espécies com fertilização externa, como observado em Penaeidae (Alfaro *et al.* 2007).

Os espermatozoides de peneídeos são compactados em um envoltório protetor (espermatóforo), que abriga uma densa massa espermática embebida em uma matriz extracelular. Durante a cópula, o macho transfere o espermatóforo para a fêmea (Bauer 1991, Bauer & Cash 1991). Em espécies de tético fechado, o espermatóforo é estocado

internamente, enquanto naquelas de téglico aberto, ele é aderido externamente. Apesar da cópula, a fertilização é externa, pois as fêmeas liberam simultaneamente os ovócitos e os espermatozoides na água durante a desova. Com os movimentos dos pleópodes, as fêmeas misturam externamente os gametas, iniciando as interações entre eles (Dall *et al.* 1990). A capacitação tem sido observada em camarões de téglico fechado e aberto (Wikramanayake *et al.* 1992, Alfaro *et al.* 2007).

Alguns peneídeos são abundantes no litoral brasileiro, tais como *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante, 1967) e *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1987). *Farfantepenaeus paulensis* é distribuído de Ilhéus, Brasil, até Mar del Plata, Argentina (D'Incao 1991). Enquanto, *F. brasiliensis* ocorre desde a Carolina do Norte, EUA, até o Rio Grande do Sul, Brasil (Pérez-Farfante & Kensley 1997). O ciclo de vida em ambas as espécies é caracterizado pela reprodução e desova no oceano e crescimento em áreas estuarinas (Valentini *et al.* 1991).

Em suas principais áreas de distribuição, ambas as espécies são importantes recursos pesqueiros. O interesse comercial no camarão rosa é justificado pelos melhores preços em comparação com o camarão branco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), especialmente no mercado asiático. Assim, *F. brasiliensis* é um dos principais camarões capturados nas costas brasileira e mexicana, enquanto *F. paulensis* é um importante pesqueiro no sul e sudeste do Brasil (Valentini *et al.* 1991, Almeida & D'Incao 1999, Pérez-Castañeda & Defeo 2001).

Complementarmente à sua importância para a pesca, *F. paulensis* e *F. brasiliensis* são de interesse para aquicultura. Larvas de *F. paulensis*, por exemplo, têm sido obtidas por meio da reprodução em cativeiro desde a década de 80 no Brasil (Marchiori & Boff 1983), existindo um pacote tecnológico desenvolvido para maturação e desova da espécie (Peixoto *et al.* 2011). O domínio de técnicas de

reprodução de *F. paulensis* viabilizou a produção comercial em cercados no estuário da Lagoa dos Patos na década passada (Poersch *et al.* 2006). Em contrapartida, o interesse no cultivo de *F. brasiliensis* é mais recente e tem sido motivado por observações de rusticidade às condições de cultivo, como, por exemplo, à indução gonadal de fêmeas por meio da ablação unilateral do pedúnculo ocular (Braga *et al.* 2011). Tendo em vista a rusticidade e outras características, como a ampla distribuição latitudinal, o tamanho máximo dos adultos maior do que de outros peneídeos e taxas de crescimento relativamente boas em comparação com outras espécies de *Farfantepenaeus*, a espécie tem sido considerada uma potencial candidata para aquicultura (Gaxiola *et al.* 2010, Braga *et al.* 2011). Porém, a falta de estudos sobre nutrição e seleção genética limita atualmente a concretização do cultivo de *F. brasiliensis*.

Estudos morfológicos de gametas de *Farfantepenaeus* têm sido realizados na Estação Marinha de Aquicultura do Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (EMA-FURG) (Peixoto *et al.* 2002, 2003, Braga *et al.* 2013b). Estes estudos são principalmente voltados para *F. paulensis*. Para *F. brasiliensis*, os primeiros estudos morfológicos da reprodução realizados na EMA-FURG estão incluídos na presente tese. No entanto, em outros centros de pesquisa têm sido realizados estudos sobre aspectos morfológicos da reprodução de *F. brasiliensis*. Entre estes, foram descritos previamente o comportamento da espécie durante a cópula e uma escala de maturação ovariana definida com base em características morfo-histológicas (Brisson 1986, Quintero & Garcia 1998), sendo, portanto, limitadas as informações sobre a reprodução de *F. brasiliensis*. Diante do exposto acima, a presente tese está centrada no estudo de aspectos morfológicos e evolutivos de estruturas reprodutivas de machos de *F. paulensis* e *F. brasiliensis*, tais como espermatozoides e espermatóforos.

## ESTRUTURA DA TESE

A presente tese é composta por cinco capítulos. Os três primeiros tratam sobre aspectos morfológicos e evolutivos do espermatozoide de *F. paulensis* e *F. brasiliensis*. Nos outros dois, aspectos morfológicos do espermatóforo de *F. brasiliensis* são abordados. Uma breve descrição destes capítulos é apresentada abaixo.

No Capítulo 1, a diversidade e a evolução dos espermatozoides uniestrelados de Decapoda são abordadas. A morfologia do espermatozoide de *F. paulensis*, única espécie de *Farfantepenaeus* até então estudada, está incluída neste capítulo. O capítulo é parte de uma revisão mais abrangente publicada no periódico *Zoomorphology* no ano de 2013. No Capítulo 2, a ultraestrutura do espermatozoide de *F. brasiliensis* é descrita, relacionando-a a evolução da morfologia na linhagem de camarões semelhantes à peneídeos. O manuscrito correspondente a este capítulo encontra-se submetido para publicação no periódico *Arthropod Structure & Development*. No Capítulo 3, a morfologia da capacitação do espermatozoide de *F. paulensis* após a estocagem do espermatóforo no télico é descrita. No Capítulo 4, a regeneração do espermatóforo de *F. brasiliensis* é descrita, sendo avaliado o efeito da muda nesse processo. No Capítulo 5, a ocorrência da melanização hemocítica do espermatóforo de *F. brasiliensis* ocasionada pela extrusão manual é demonstrada histologicamente.

Após os capítulos, são apresentadas Conclusões Gerais, nas quais os aspectos morfológicos e evolutivos das estruturas reprodutivas consideradas na presente tese são concluídos de maneira integrada.

## OBJETIVOS

### *Geral:*

Avaliar aspectos morfológicos e evolutivos dos espermatozoides e espermatóforos de *F. paulensis* e *F. brasiliensis*.

### *Específicos:*

1. Analisar a evolução da morfologia de espermatozoides uniestrelados de Decapoda.
2. Descrever a ultraestrutura do espermatozoide de *F. brasiliensis*, relacionando-a com a evolução da morfologia na linhagem de camarões semelhantes à peneídeos.
3. Identificar e descrever as mudanças morfológicas apresentadas pelos espermatozoides de *F. paulensis* referentes ao processo de capacitação após a estocagem do espermatóforo no télico.
4. Avaliar a regeneração do espermatóforo de *F. brasiliensis* e o efeito da muda neste processo.
5. Avaliar a melanização do espermatóforo de *F. brasiliensis* após sucessivas extrusões manuais.



## HIPÓTESES

Abaixo seguem as hipóteses de trabalho estabelecidas na presente tese:

i) A condição uniestrelada do acrossoma é resultante de evolução convergente entre Dendrobranchiata e Pleocyemata;

ii) A ultraestrutura do espermatozoide de *F. brasiliensis* é congruente com o padrão generalizado de Peneini, sendo este o mais próximo daquele apresentado pelo ancestral comum exclusivo da linhagem de camarões semelhantes à peneídeos;

iii) O espermatozoide de *F. paulensis* sofre mudanças morfológicas após a estocagem do espermatóforo no télico;

vi) A regeneração do espermatóforo de *F. brasiliensis* é um processo gradual afetado pela muda.

v) A melanização do espermatóforo de *F. brasiliensis* pode ser decorrente de um processo inflamatório ocasionado pela extrusão manual.

## **CAPÍTULO 1**

### **EVOLUÇÃO DA MORFOLOGIA DE ESPERMATOZOIDES UNIESTRELADOS DE DECAPODA<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Artigo publicado: BRAGA, A, CL NAKAYAMA, LH POERSCH & W WASIELESKY. 2013. Unistellate spermatozoa of decapods: comparative evaluation and evolution of the morphology. *Zoomorphology*, 132: 261-284.

## INTRODUÇÃO

O padrão morfológico dos espermatozoides de Decapoda é único entre os demais grupos de animais. Os espermatozoides de decápodes são desprovidos de flagelo e, por isso, não apresentam motilidade. Ultraestruturalmente, esses espermatozoides são compostos de um corpo principal, o qual geralmente é dividido em regiões acrossômica e pró-nuclear formada por cromatina não condensada (Felgenhauer & Abele 1991, Jamieson 1991, Jamieson & Tudge 2000, Tudge 2009).

Os espermatozoides de decápodes foram originalmente classificados como uni ou multiestrelados (Medina 1994). Os multiestrelados são típicos da subordem Pleocyemata, exceto as infra-ordens Stenopodidea e Caridea. Assim, esse tipo de espermatozoide é observado em caranguejos, siris, ermitões, lagostas, lagostins, etc (Felgenhauer & Abele 1991). O padrão generalizado de um espermatozoide multiestrelado consiste de vários apêndices caracterizados por serem extensões do citoplasma e/ou do pró-núcleo, contendo, portanto, microtúbulos e/ou cromatina (Jamieson 1991, Medina & Rodriguez 1992, Jamieson & Tudge 2000, Cuartas & Sousa 2007, Tudge 2009).

Os espermatozoides uniestrelados, por sua vez, ocorrem em carídeos e nas famílias Penaeidae, Sicyoniidae e Solenoceridae (subordem Dendrobranchiata). Este tipo de espermatozoide de Decapoda é caracterizado por apresentar um único apêndice acrossômico e que, portanto, não é contínuo com o citoplasma nem com o pró-núcleo (Lynn & Clark 1983b, Shigekawa & Clark 1986, Clark & Griffin 1988).

A ultraestrutura dos espermatozoides das famílias dendrobranquiatas Benthescymidae e Luciferidae ainda não é conhecida. Essa limitação impede a confirmação de quais e quantos são os padrões morfológicos apresentados por

decápodes. No entanto, é sabido que no mínimo um padrão destoante de multi e uniestrelado ocorre em Decapoda. Por exemplo, os espermatozoides de Stenopodidea e das famílias Aristeidae e Sergestidae (Dendrobranchiata) não apresentam apêndices (Jamieson & Tudge 2000), evidenciando a necessidade de reconsideração da classificação dos tipos morfológicos de espermatozoides de decápodes (Medina 1995a).

O estudo da ultraestrutura de espermatozoides tem sido aplicado em investigações filogenéticas de crustáceos em geral. Um dos exemplos mais bem sucedidos da aplicação do padrão morfológico do espermatozoide em filogenia foi aquele que sugeriu a inclusão do então filo Pentastomida em Crustacea (Storch & Jamieson 1992). Posteriormente, análises morfológicas e moleculares corroboraram Pentastomida como uma subclasse de Maxillopoda (Halanych 2004).

A maior parte dos estudos sobre ultraestrutura de espermatozoides de decápodes tem investigado as relações de táxons multiestrelados. Por exemplo, Tudge (1997) propôs uma filogenia de Anomura, enquanto Tirelli *et al.* (2010) investigaram a posição filogenética de espécies de Diogenidae (Anomura), ambos com base na morfologia dos espermatóforos e dos espermatozoides. Guinot *et al.* (1994) propuseram Podotremata como um grupo monofilético dentro de Brachyura baseados na ultraestrutura dos espermatozoides. De maneira semelhante, outros autores investigaram as relações filogenéticas em Anomura e Brachyura com base na ultraestrutura de espermatozoides, tais como Jamieson & Tudge (1990), Jamieson (1994) e Jamieson *et al.* (1995).

Em contrapartida, a falta de informações sobre a ultraestrutura de espermatozoides uniestrelados tem inviabilizado investigações filogenéticas confiáveis. A limitação de informações sobre espermatozoides uniestrelados pode ser exemplificada pelo fato de não haver descrições da ultraestrutura de espermatozoides da

tribo Trachypeneini (Penaeidae) disponíveis na literatura. Para esta tribo, apenas a configuração externa do espermatozoide tem sido investigada por meio de microscopia eletrônica de varredura (Bauer & Min 1993, Alfaro *et al.* 2003).

Sobre os dados limitados de espermatozoides uniestrelados, Medina *et al.* (2006b) comentam o quão é dificultoso realizar uma análise filogenética apenas com base em caracteres das células espermáticas. Essa limitação torna impraticável a execução de análises de parcimônia confiáveis. Desta forma, estudos descritivos e comparativos são necessários para a formação de um banco de dados, que contribua para a pesquisa das relações filogenéticas de decápodes (Medina 1995a, Scelzo & Medina 2004).

Medina *et al.* (2006b) recomendam também o uso integrado dos resultados de análises moleculares com os de estudos morfológicos do espermatozoide, visando melhorar o conhecimento da evolução da morfologia. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo analisar comparativamente a diversidade dos espermatozoides uniestrelados, utilizando as relações filogenéticas entre decápodes atualmente aceitas para investigar a evolução da morfologia desse tipo de espermatozoide.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

No presente estudo, padrões morfológicos dos espermatozoides uniestrelados de Pleocyemata e Dendrobranchiata foram identificados por meio de descrições da morfologia interna ou externa da célula espermática de 38 espécies disponíveis na literatura. Dentre essas espécies, 17 eram de Pleocyemata e 21 eram de Dendrobranchiata. Na Tabela 1.1, as espécies e fontes bibliográficas utilizadas neste estudo, assim como a morfometria dos espermatozoides, estão discriminadas.

Tabela 1.1: Espécies consideradas no presente estudo e a morfometria de seus espermatozoides.

Espécies	Comprimento total	Corpo principal		Comprimento do espinho	Fontes bibliográficas
		Comprimento	Diâmetro		
<b>Pleocyemata</b>					
<b>Caridea</b>					
<b>Procarididae</b>					
<i>Procaris ascensionis</i> Chace and Manning, 1972	28	-	-	18	Felgenhauer <i>et al.</i> (1988)
<b>Atyidae</b>					
<i>Paratya australiensis</i> (Kemp, 1917)	-	-	-	-	Jamieson & Tudge (2000)
<b>Rhynchocinetidae</b>					
<i>Rhynchocinetes typus</i> H. Milne Edwards, 1837	-	14	30	53	Dupré & Barros (1983)
<i>Rhynchocinetes uritai</i> Kubo, 1942	-	-	-	-	Bauer & Thiel (2011)
<b>Palaemonidae</b>					
<i>Macrobrachium australiense</i> Holthuis, 1950	-	-	9 - 10	13 - 15	Butcher & Fielder (1994)
<i>Macrobrachium rosenbergii</i> (De Man, 1879)	-	4	9 - 10	12 - 15	Lynn & Clark (1983b)
<i>Palaemon elegans</i> De Man, 1892	-	-	-	-	Pochon-Masson (1969)
<i>Palaemon serratus</i> (Pennant, 1777)	-	-	-	-	Papathanassiou & King (1984)
<i>Palaemonetes kadiakensis</i> (Rathbun, 1902)	-	-	-	-	Felgenhauer <i>et al.</i> (1988)
<i>Palaemonetes paludosus</i> (Gibbes, 1850)	-	-	10 - 12	12 - 14	Koehler (1979)
<b>Hippolytidae</b>					
<i>Exhippolysmata oplophoroides</i> (Holthuis, 1948)	-	-	-	-	Nunes <i>et al.</i> (2010)
<i>Hippolyte inermis</i> Leach, 1816	-	-	-	-	Cobos <i>et al.</i> (2011)
<i>Hippolyte niezabitowskii</i> d'Udekem d'Acoz, 1996	-	-	-	-	Manjón-Cabeza <i>et al.</i> (2011)
<i>Hippolyte obliquimanus</i> Dana, 1852	-	2 - 3	4 - 5	3 - 3.2	Terossi <i>et al.</i> (2012)
<i>Lysmata wurdemanni</i> (Gibbes, 1850)	-	-	-	-	Bauer & Holt (1998)
<b>Pandalidae</b>					
<i>Pandalopsis japonica</i> Balss, 1914	52 - 55	24 - 26	-	40 - 44	Kim <i>et al.</i> (2003)
<b>Crangonidae</b>					
<i>Crangon septemspinosa</i> Bražnikov, 1907	-	-	-	-	Arsenault <i>et al.</i> (1979)
<b>Dendrobranchiata</b>					
<b>Penaeidae</b>					
<b>Parapeneini</b>					
<i>Artemesia longinaris</i> Spence Bate, 1888	6	-	3.4	2.5	Scelzo & Medina (2003)
<i>Parapenaeus longirostris</i> (Lucas, 1846)	5.5	-	4.2	3	Medina (1994)
<i>Penaeopsis serrata</i> Spence Bate, 1881	6.37	-	3.49	3.36	Medina <i>et al.</i> (1994a)
<b>Peneini</b>					
<i>Farfantepenaeus paulensis</i> (Pérez Farfante, 1967)	10.71	*	5.56	5.15	Braga <i>et al.</i> (2013b)
<i>Fenneropenaeus chinensis</i> (Osbeck, 1765)	-	*	-	-	Kang <i>et al.</i> (2008)
<i>Fenneropenaeus indicus</i> (H. Milne Edwards, 1837)	-	*	-	5 - 7	Mohamed & Diwan (1993)
<i>Litopenaeus occidentalis</i> (Streets, 1871)	-	*	4	3	Alfaro <i>et al.</i> (2003)
<i>Litopenaeus schmitti</i> (Burkenroad, 1936)	-	-	-	-	Fernandes (2013)
<i>Litopenaeus stylirostris</i> (Stimpson, 1871)	-	*	6.5	-	Alfaro <i>et al.</i> (2007)
<i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone, 1931)	-	*	4-3	-	Alfaro <i>et al.</i> (2007)
<i>Marsupenaeus japonicus</i> (Spence Bate, 1888)	7.9	*	4.7	4	Medina <i>et al.</i> (1994b)
<i>Penaeus kerathurus</i> (Forskål, 1775)	5	*	2.9	2.5	Medina <i>et al.</i> (1994b)
<i>Penaeus monodon</i> Fabricius, 1798	-	*	-	-	Pongtippatee <i>et al.</i> (2007)
<b>Trachypeneini</b>					
<i>Trachypenaeus byrdi</i> Burkenroad, 1934	-	6	-	3.5	Alfaro <i>et al.</i> (2003)
<i>Trachypenaeus similis</i> (Smith, 1885)	-	-	-	-	Bauer & Min (1993)
<i>Xiphopenaeus riveti</i> Bouvier, 1907	-	11 - 12	-	4	Alfaro <i>et al.</i> (2003)
<b>Sicyoniidae</b>					
<i>Sicyonia carinata</i> (Brünnich, 1768)	6.54	*	3.4	3.01	Medina <i>et al.</i> (1994a)
<i>Sicyonia ingentis</i> (Burkenroad, 1938)	-	*	3	3	Clark & Griffin (1988)
<b>Solenoceridae</b>					
<i>Solenocera membranacea</i> (Risso, 1816)	4.5	*	2.55	2.06	Medina <i>et al.</i> (2006b)
<i>Solenocera africana</i> Stebbing, 1917	-	*	-	-	Medina <i>et al.</i> (2006b)
<i>Pleoticus muelleri</i> (Spence Bate, 1888)	3.95	*	2.18	1.90	Medina <i>et al.</i> (2006b)

A tabela é composta apenas por dados descritos pelos autores nos seus estudos.

\*Espermatozoide esférico, logo o comprimento do corpo corresponde ao diâmetro.

Para a análise da evolução da morfologia, um cladograma foi construído com base nas seguintes hipóteses filogenéticas para Decapoda disponíveis na literatura:

- a) Monofilia de Reptantia (Bracken *et al.* 2009, Shen *et al.* 2013);
- b) Monofilia de Stenopodidea (Fransen & De Grave 2009);
- c) Caridea é mais basal do que Stenopodidea (Shen *et al.* 2013);
- d) Separação da superfamília Procaridoidea de Caridea, formando uma infra-ordem basal de Pleocyemata, Procarididea (Bracken *et al.* 2010);
- e) Monofilia de Sergestoidea (Tavares *et al.* 2009);
- f) Duas linhagens evolutivas distintas dentro de Penaeoidea: camarões semelhantes à aristeídeos, incluindo Solenoceridae (mais basal), Benthescymidae e Aristeidae (mais derivado); e camarões semelhantes à peneídeos, incluindo Penaeidae (mais basal) e Sicyoniidae (mais derivado) (Ma *et al.* 2009).

A partir dessas relações filogenéticas, hipóteses sobre a evolução da morfologia do espermatozoide foram inferidas com base nos princípios de sistemática filogenética.

## **RESULTADOS**

### ***Diversidade morfológica dos espermatozoides uniestrelados***

Dentre os espermatozoides uniestrelados considerados no presente estudo, quatro tipos morfológicos generalizados relacionados ao formato do corpo principal foram identificados: (1) em forma de taça invertida, como observado em todos Pleocyemata uniestrelados estudados; (2) esféricos observados em Sicyoniidae, Solenoceridae e Peneini; (3) abaulados, típico de Parapeneini; (4) e alongados em Trachypeneini. Os quatro padrões morfológicos de espermatozoides uniestrelados estão ilustrados na Figura 1.1.

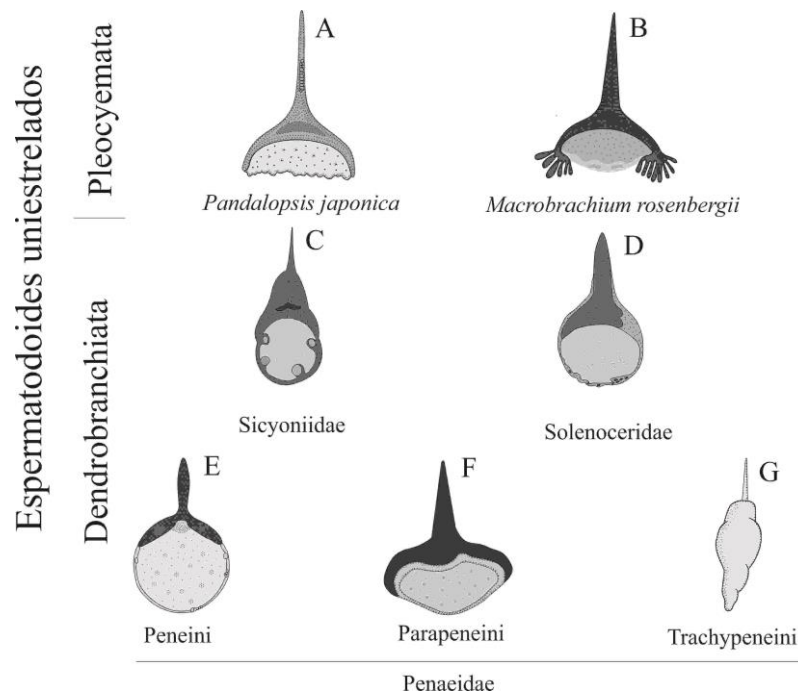


Figura 1.1: Diversidade de espermatozoides uniestrelados. (A-B) Espermatozoides em forma de taça invertida. (C-E) Espermatozoides esféricos. (F) Espermatozoide abaulado. (G) Espermatozoide alongado. (A) *Pandalopsis japonica* (modificado de Kim *et al.* 20003). (B) *Macrobrachium rosenbergii* (modificado de Lynn & Clark 1983b). (C) *Sicyonia ingentis* (modificado de Shigekawa & Clark 1986). (D) *Solenocera membranacea* (modificado de Medina *et al.* 2006b). (E) *Farfantepenaeus paulensis* (modificado de Braga *et al.* 2013b). (F) *Artemesia longinaris* (modificado de Scelzo & Medina 2003). (G) *Xiphopenaeus riveti* (modificado de Alfaro *et al.* 2003).

Além da forma de taça invertida do corpo principal, os espermatozoides uniestrelados de Pleocyemata apresentam o pró-núcleo côncavo. Esta região é composta por cromatina não condensada, o que atribui uma aparência floculada. O envoltório pró-nuclear pode estar ausente ou apresentar rupturas parciais. O citoplasma corresponde a uma região entre o pró-núcleo e a base do espinho e é geralmente composto por vesículas e lamelas. Mitocôndrias e centríolos podem estar presentes. A região acrossômica é composta por um capuz acrossômico que projeta anteriormente o espinho. O material que compõe o capuz e o espinho varia entre as espécies, podendo ser estrias transversais, fibras radiais, grânulos ou estruturas tubulares. Porém, em uma



mesma espécie, esse material é sempre homogêneo entre capuz e espinho, por isso o acrossoma de espermatozoides uniestrelados de Pleocyemata não é zoneado.

Apesar da distinção dos espermatozoides uniestrelados de Dendrobranchiata em três tipos básicos (esférico, abaulado e alongado), estes se diferenciam daqueles uniestrelados observados em Pleocyemata. Por exemplo, a ruptura do envoltório pró-nuclear é sempre total e o pró-núcleo é esférico ou ovoide. O citoplasma é composto por lamelas e vesículas, como em Pleocyemata. Porém, em dendrobranquiatas, esta região é uma fina camada perinuclear e organelas nunca estão presentes. A região acrossômica é zoneada em vesícula acrossômica e região subacrossômica, formados por material heterogêneo. A vesícula acrossômica é dividida em capuz acrossômico, que se estende lateralmente ao corpo principal, e o espinho, que é projetado a partir da região central do capuz acrossômico. A região subacrossômica é localizada entre o pró-núcleo e a base do espinho. As semelhanças e diferenças observadas entre espermatozoides uniestrelados em pleociematas e dendrobranquiatas estão listadas na Tabela 1.2.

Tabela 1.2: Principais caracteres dos espermatozoides uniestrelados de Pleocyemata e Dendrobranchiata.

	<b>Pleocyemata</b>	<b>Dendrobranchiata</b>
Formato do corpo	Forma de taça invertida	Esférico, abaulado ou alongado
Formato do pró-núcleo	Côncavo	Esférico ou ovoide
Envoltório pró-nuclear	Ruptura parcial ou total	Sempre ruptura total
Estado da cromatina	Não condensada	Não condensada
Localização do citoplasma	Entre pró-núcleo e espinho	Perinuclear
Composição do citoplasma	Lamela e vesículas	Lamela e vesículas
Organelas	Podem estar presentes	Sempre ausentes
Complexidade da região acrossômica	Simples	Zoneada

Outra diferença marcante observada entre espermatozoides uniestrelados de Pleocyemata e Dendrobranchiata está relacionada à morfometria. As espécies estudadas de pleociematas apresentam espermatozoides maiores do que as dendrobranquiatas. Adicionalmente, na maioria dos pleociematas o comprimento do espinho é duas ou três vezes maior do que o do corpo. Dentre os dendrobranchiatas, os comprimentos do corpo principal e do espinho são geralmente proporcionais. Exceção deste padrão é observada para Trachypeneini, na qual o corpo principal corresponde a duas ou três vezes ao comprimento do espinho, como resultado da forma alongada do primeiro (Tab. 1.1).

### *Evolução de espermatozoides uniestrelados em Decapoda*

Na Figura 1.2 está demonstrado o cladograma construído a partir das hipóteses filogenéticas consideradas no presente estudo. No cladograma foram incluídas as apomorfias identificadas neste estudo para cada grupo.

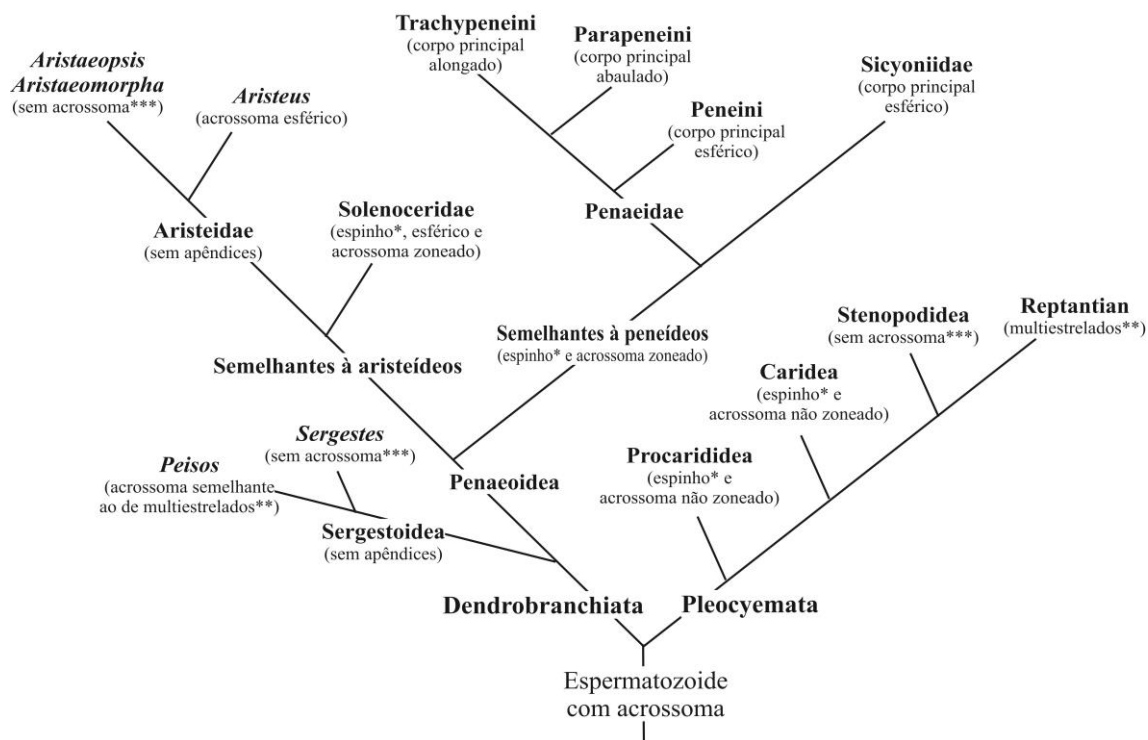


Figura 1.2: Evolução de espermatozoides uniestrelados de Decapoda. Evolução convergente entre Pleocyemata e Dendrobranchiata (\*); *Peisios* e Reptantia (\*\*); e *Stenopodídea*, *Sergestes* e *Aristeidae* (\*\*\*).

## DISCUSSÃO

A ultraestrutura do espermatozoide é amplamente diversa entre os decápodes. No entanto, alguns padrões morfológicos podem ser observados. Por exemplo, Medina (1995b) relata que a ruptura parcial ou total do envoltório pró-nuclear e a ausência de flagelo são simplesiomorfias de Decapoda. Tudge (2009) enumera outras características dos espermatozoides de decápodes: (1) ausência de motilidade como consequência da ausência do flagelo; (2) origem da vesícula acrossômica a partir do retículo endoplasmático, diferentemente de todos os outros grupos animais, cujo acrossoma se origina do complexo de Golgi; (3) proteína pró-nuclear única entre os animais; (4) pró-núcleo composto por fibras de cromatina heterogêneas, filamentosas e difusas; (5) ausência de mitocôndrias.

Os espermatozoides uniestrelados de Pleocyemata e Dendrobranchiata investigados no presente estudo obviamente compartilham os caracteres típicos de decápodes. No entanto, algumas diferenças são observadas entre os espermatozoides desses grupos, como sumarizado na Tabela 1.2. Por exemplo, o espinho não parece ser homólogo entre pleocyematas e dendrobranchiatas. Nos primeiros, o espinho é homogêneo ao capuz acrossômico, enquanto nos dendrobranchiatas ele é composto de material diferente do restante da região acrossômica (Jamieson 1991, Jamieson & Tudge 2000). Desta forma, a hipótese de que o espinho, que caracteriza a condição uniestrelada, é resultante de convergência evolutiva entre pleociematas e dendrobranchiatas deve ser considerada.

A hipótese de homoplasia para explicar a condição uniestrelada em pleociematas e dendrobranchiatas seria corroborada pelo fato de que considerar esta condição como apomorfia de um hipotético clado Caridea-Dendrobranchiata, implicaria em Pleocyemata parafilético. No entanto, a monofilia tanto de

Dendrobranchiata quanto de Pleocyemata tem sido amplamente aceita (Martin & Davis 2001, Ahyong & O'Meally 2004, Tsang *et al.* 2008, Bracken *et al.* 2009, Toon *et al.* 2009, Shen *et al.* 2013).

Os espermatozoides uniestrelados de Pleocyemata apresentam alguns caracteres também observados em multiestrelados, tais como a presença eventual de centríolos na base do acrossoma e citoplasma localizado entre a região anterior do pró-núcleo e a base do acrossoma. Esses caracteres compartilhados suportam certa relação entre os membros de Pleocyemata. No entanto, além do espinho, apomorfias são observadas nos espermatozoides uniestrelados de Pleocyemata, como por exemplo, o pró-núcleo côncavo (Jamieson 1991, Medina 1994, 1995a, Jamieson & Tudge 2000, Tudge 2009). Adicionalmente, Caridea apresenta um processo de fertilização único entre os decápodes, no qual não há reação acrossômica visível e o espermatozoide inteiro é incorporado no ovócito (Lynn & Clark 1983a, Barros *et al.* 1986, Chow & Sandifer 2001). Essas características são evidências relacionadas à ultraestrutura do espermatozoide que corroboram que Caridea é uma linhagem evolutiva independente dentro de Decapoda (Medina 1994, 1995a, Jamieson & Tudge 2000), reforçando a hipótese de convergência evolutiva entre os espermatozoides uniestrelados.

Enquanto a monofilia dos principais táxons de decápodes tem sido corroborada por análises morfológicas e moleculares, o posicionamento evolutivo dos grupos tem sido bastante controverso. A maioria dos autores tem concordado com a posição basal de Dendrobranchiata, enquanto a posição de Stenopodidea e Caridea tem demandado maior debate (Schram 2001, Ahyong & O'Meally 2004, Tsang *et al.* 2008, Bracken *et al.* 2009, Fransen & De Grave 2009, Toon *et al.* 2009). No entanto, recentemente Shen *et al.* (2013) analisaram a filogenia de decápodes usando genomas mitocondriais de 50 espécies e sugeriram que Caridea é mais basal do que Stenopodidea. A relação evolutiva

entre os decápodes atualmente aceita (Shen *et al.* 2013), com Dendrobranchiata (espermatozoides uniestrelados ou sem acrossoma) e Caridea (uniestrelados) mais basais do que Stenopodidea (sem acrossoma) e Reptantia (multiestrelados), é importante para avaliar a evolução da morfologia do acrossoma em decápodes.

Há controvérsias para suportar a condição sem acrossoma como plesiomorfia ou apomorfia de decápodes. Inicialmente, a ausência de acrossoma foi sugerida como plesiomórfica com base no fato de que essa condição é compartilhada por Euphausiacea, Stenopodidea e alguns Dendrobranchiata (Aristeidae e Sergestidae) (Medina 1995a). Conforme essa hipótese, esta condição seria plesiomórfica para Eucarida, uma vez que análises filogenéticas indicavam que os ancestrais de decápodes eram semelhantes à eupausiáceos. Adicionalmente, a hipótese de que o espermatozoide do ancestral de decápodes possuía acrossoma e de que houve a perda independente do acrossoma em várias linhagens evolutivas de Eucarida (menos parcimoniosa) parecia improvável (Medina 1995a, b, Jamieson & Tudge 2000). Entretanto, com base nos resultados de análises moleculares do início da década passada foi sugerido que Euphausiacea é mais relacionada filogeneticamente com Peracarida do que com Decapoda (Jarman *et al.* 2000, Richter & Scholtz 2001). Além disso, perdas repetidas do acrossoma têm sido descritas em várias linhagens evolutivas independentes de crustáceos (Jamieson 1991). Desta forma, a possibilidade de que a condição sem acrossoma represente uma apomorfia dentro de Decapoda foi considerada (Medina *et al.* 2006a, b).

Resultados recentes de análises filogenéticas de decápodes têm provido novos argumentos para essa discussão. Por exemplo, Bracken *et al.* (2010) propuseram a separação da superfamília Procaridoidea de Caridea, formando uma infra-ordem separada de Pleocyemata (Procarididea). A estrutura acrossômica não zoneada

observada no espermatozoide de *Procaris ascensionais* Chace & Manning, 1972 parece homóloga com aquela descrita para os demais espermatozoides uniestrelados de Pleocyemata, isto é, para Caridea (Felgenhauer *et al.* 1988, Jamieson & Tudge 2000). Desta forma, a presença de um acrossoma nas linhagens evolutivas independentes mais basais de Decapoda (Dendrobranchiata, Procarididea e Caridea) corrobora a hipótese de que o espermatozoide original desta ordem tinha um acrossoma. Logo, a ausência do acrossoma seria apomórfica para Decapoda e uma homoplasia resultante de evolução convergente entre Stenopodidea, Aristeidae e Sergestidae, como previamente sugerido por Scelzo & Medina (2004).

A respeito do reconhecimento de Procaridoidea como uma infra-ordem de Caridea (Bracken *et al.* 2010), sob a ótica da ultraestrutura do espermatozoide, é importante ressaltar que, apesar do acrossoma homólogo com Caridea, o espermatozoide de *P. ascensionis* possui cristas fibrosas na margem posterior do corpo principal como apomorfia da espécie (Felgenhauer *et al.* 1988). O espermatozoide de *P. ascensionis* é o único descrito ultraestruturalmente dentre os representantes de Procaridoidea. Desta forma, mais estudos são necessários para confirmar a apomorfia do grupo em acordo com a hipótese sugerida por Bracken *et al.* (2010) de que Procaridoidea é uma linhagem evolutiva distinta de Caridea.

Para Dendrobranchiata, Medina (1995a) e Jamieson & Tudge (2000) têm sugerido como simplesiomorfias: (a) cromatina filamentosa; (b) citoplasma perinuclear; (c) ausência de centríolos; (d) perda completa do envoltório nuclear. Dentre os representantes dessa subordem, apenas Penaeoidea apresenta espermatozoide uniestrelado. Para Sergestoidea, apenas espermatozoides de Sergestidae são conhecidos ultraestruturalmente e têm em comum entre eles a falta de apêndices acrossômicos e/ou pró-nucleares (Medina 1995a, Scelzo & Medina 2004). Burkenroad (1981) observou

espermatozoides de *Lucifer faxoni* Borradaile, 1915 (Luciferidae) sob microscopia óptica e relatou a ausência de apêndices externos, como observado para sergestídeos. No entanto, a ultraestrutura do espermatozoide de Luciferidae permanece desconhecida.

Em Sergestidae, *Sergestes arcticus* Krøyer, 1855 compartilha o espermatozoide composto por uma célula ovoide com cromatina central circundado completamente pelo citoplasma e ausência de um acrossoma, como em algumas espécies de aristeídeos, Stenopodidea e Euphausiacea (Jamieson 1991, Jamieson & Tudge 2000, Tudge 2009). Como discutido anteriormente, essa condição é provavelmente resultante de homoplasia (Scelzo & Medina 2004).

Em contrapartida, um padrão morfológico distinto é observado em outro sergestídeo. Em *Peisos petrunkevitchi* Burkenroad, 1945, o acrossoma está disposto concentricamente em torno de um perforatório, dividindo-se em uma zona acrossômica interna e outra externa. Adicionalmente, essa espécie apresenta um par de centríolos apomórfico na base do acrossoma (Scelzo & Medina 2004). Este tipo de configuração do acrossoma é bastante similar ao observado em alguns espermatozoides multiestrelados, com a diferença de que as múltiplas armas pró-nucleares (apêndices) não são observadas em *P. petrunkevitchi* (Jamieson 1991, Jamieson & Tudge 2000, Scelzo & Medina 2004).

Jamieson (1991) sugere que a ausência de armas é uma plesiomorfia de Eucarida, o que indica que esta condição foi mantida em *P. petrunkevitchi*, apesar das similaridades com o acrossoma de espermatozoides multiestrelados. Desta forma, assim como ocorre para a perda do acrossoma, Scelzo & Medina (2004) sugerem que o acrossoma dividido em zona externa e interna em torno de um perforatório em *P. petrunkevitchi* é resultante de evolução convergente com Reptantia.

Para Penaeoidea, Ma *et al.* (2009) sugeriram a sua divisão em duas linhagens evolutivas independentes: camarões semelhantes à aristeídeos (Aristeidae, Benthescymidae e Solenoceridae) e à peneídeos (Penaeidae e Sicyoniidae). A consequência dessa hipótese na análise da evolução da morfologia do espermatozoide é que o acrossoma uniestrelado seria uma plesiomorfia de Penaeoidea, pois essa estrutura parece homóloga em ambas as linhagens. Adicionalmente, a hipótese de duas linhagens evolutivas de Penaeoidea sugere que o clado Solenoceridae-Penaeidae-Sicyoniidae, originalmente proposto por alguns autores devido a presença de um único apêndice de origem acrossômica (o espinho) (Medina 1995a, Scelzo & Medina 2004, Medina *et al.* 2006a, b), seja na realidade parafilético.

Dentre os camarões semelhantes à aristeídeos com espermatozoides previamente estudados, Solenoceridae seria mais basal (Ma *et al.* 2009) e apresenta o capuz acrossômico assimétrico lateralmente como apomorfia que distingue claramente seus espermatozoides dos demais uniestrelados (Medina 1995a, b, Medina *et al.* 2006b). Por outro lado, Aristeidae apresenta dois padrões morfológicos, ambos apomórficos para Penaeoidea: um apresentado por espécies de *Aristeus* e caracterizado pela ausência do espinho, sendo o acrossoma esférico e o citoplasma subacrossômico (Demestre & Fortuño 1992, Medina 1995b); o outro foi descrito para *Aristaeopsis edwardsiana* (Johnson, 1868) e *Aristaemorpha foliacea* (Risso, 1827) e é caracterizado pela ausência do acrossoma, condição previamente discutida como resultante de evolução convergente com Stenopodidea, Euphausiacea e Sergestidae (Scelzo & Medina 2004).

Na linhagem de camarões semelhantes à peneídeos, Penaeidae seria mais basal (Ma *et al.* 2009) e apresenta um espermatozoide constituído de um capuz acrossômico simétrico e uma região subacrossômica simples composta por material floculado (Medina *et al.* 1994a, b, Braga *et al.* 2013b). Sicyoniidae, por sua vez, também



apresenta capuz simétrico, porém a região subacrossômica é complexa e zoneada em várias estruturas (Clark & Griffin 1988, Medina *et al.* 1994a). Desta forma, com base na hipótese filogenética proposta por Ma *et al.* (2009), é provável que o espermatozoide uniestrelado em Penaeoidea tenha evoluído a partir de estruturas acrossômicas simétricas lateralmente e simples para a assimetria do capuz em Solenoceridae e a complexidade da região subacrossômica em Sicyoniidae.

## CONCLUSÕES

No presente estudo, é sugerido que o ancestral comum exclusivo de Decapoda tinha o espermatozoide composto por um acrossoma. Mecanismos evolutivos independentes convergiram para a condição com um espinho projetado anteriormente de origem acrossômica em alguns representantes de Dendrobranchiata e Pleocyemata. Dentre os dendrobranquiatas uniestrelados, a linhagem de camarões semelhantes à peneídeos apresentam acrossoma simétrico lateralmente, sendo diferenciados pela complexidade da região subacrossômica, simples em Penaeidae e complexa em Sicyoniidae. Na linhagem de camarões semelhantes à aristeídeos, apenas Solenoceridae apresenta acrossoma uniestrelado, porém esse apresenta uma assimetria lateral apormórfica para Penaeoidea.

Dentre os pleociematas uniestrelados, as duas infra-ordens mais basais compartilham espermatozoides uniestrelados, Procarididea e Caridea. O corpo principal em forma de taça invertida e as estruturas acrossômicas não zoneadas diferenciam os espermatozoides uniestrelados de pleociematas daqueles observados em dendrobranquiatas. A condição não zoneada do acrossoma em Pleocyemata sugere que o espinho é uma estrutura análoga ao espinho de dendrobranchiatas, o qual seria, portanto, resultante de evolução convergente.

## CAPÍTULO 2

### EVIDÊNCIAS EVOLUTIVAS DA ULTRAESTRUTURA DO ESPERMATOZOIDE DE *Farfantepenaeus brasiliensis* NA LINHAGEM DE CAMARÕES SEMELHANTES À PENEÍDEOS (DECAPODA: PENAEOIDEA)<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Artigo submetido: BRAGA, A, LA SUIA DE CASTRO, LH POERSCH & W WASIELESKY. Phylogenetic significance of the spermatozoal ultrastructure of *Farfantepenaeus brasiliensis* in the penaeid-like lineage (Decapoda: Dendrobranchiata). *Arthropod Structure & Development*. Data da submissão: 24 de novembro de 2013.

## INTRODUÇÃO

Recentes hipóteses sobre as relações filogenéticas de Penaeoidea foram propostas por Ma *et al.* (2009) com base nas sequências do DNA de dois genes nucleares codificadores de proteínas, fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e subunidade alfa da Na/K ATPase (NaK). De acordo com os autores, Penaeoidea divergiu em duas linhagens evolutivas distintas: camarões semelhantes à aristeídeos, compreendendo as famílias Aristeidae, Benthesicymidae e Solenoceridae; e camarões semelhantes à peneídeos, incluindo Penaeidae e Sicyoniidae. Chu *et al.* (2009) comentaram que essas relações são fortemente congruentes com a radiação associada ao hábitat observada para Penaeoidea. Isto porque, Penaeidae e Sicyoniidae habitam principalmente águas costeiras, enquanto Aristeidae, Benthesicymidae e Solenoceridae são principalmente distribuídos em ambientes bati ou mesopelágicos (Chu *et al.* 2009).

Na linhagem de camarões semelhantes à peneídeos, Ma *et al.* (2009) relataram que os níveis de divergência genética entre as três tribos de Penaeidae (Peneini, Parapeneini e Trachypeneini) e a família Sicyoniidae são comparáveis aquelas entre Aristeidae, Benthesicymidae e Solenoceridae. Desta forma, os autores sugeriram que, para manter Sicyoniidae, as três tribos de Penaeidae deveriam ser reconhecidas como famílias separadas de Penaeoidea, denominadas: Penaeidae, Parapenaeidae e Trachypenaeidae. A monofilia de Trachypenaeidae no estudo de Ma *et al.* (2009) só é confirmada com a exclusão de *Trachypenaeopsis* (Fig. 2.1).

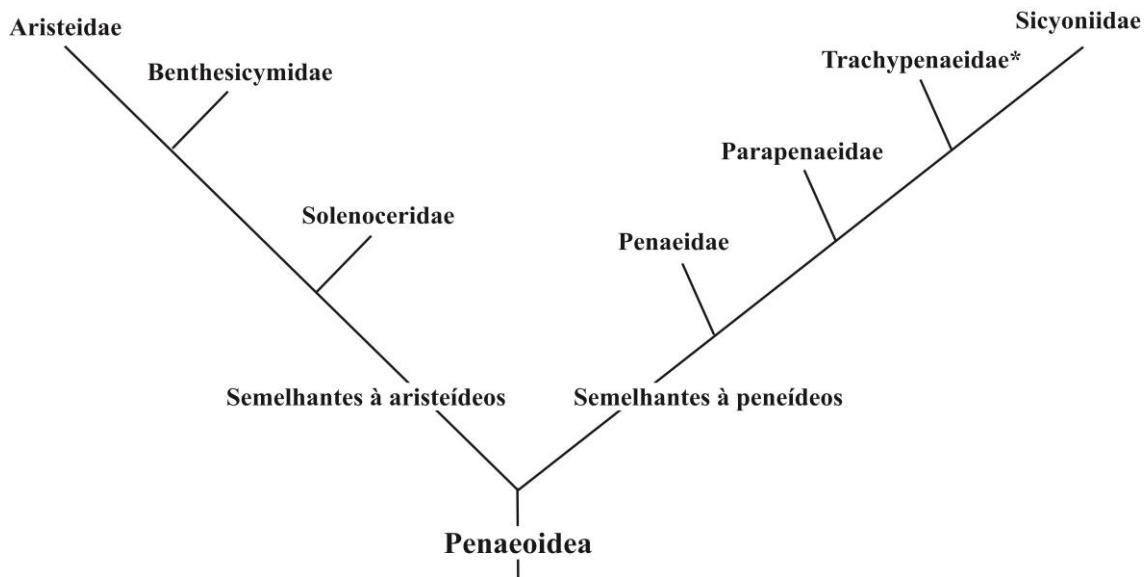


Figura 2.1: Filogenia de Penaeoidea proposta por Ma *et al.* (2009). \*A família Trachypenaeidae proposta pelos autores exclui *Trachypenaeopsis*.

De acordo com a filogenia proposta por Ma *et al.* (2009), os camarões semelhantes à peneídeos formariam um grupo diverso de camarões marinhos (Dall *et al.* 1990); porém, pouco estudado quanto à ultraestrutura dos espermatozoides. Braga *et al.* (2013a), por exemplo, listaram as espécies de Penaeidae e Sicyoniidae que foram estudadas quanto à morfologia do espermatozoide. Apenas 17 espécies têm descrições da morfologia externa ou interna dos espermatozoides disponíveis na literatura.

Análises sobre a evolução do espermatozoide de camarões semelhantes à peneídeos ainda são inexistentes na literatura. Em adição, para *Farfantepenaeus*, somente o espermatozoide de *F. paulensis* foi previamente investigado (Braga *et al.* 2013b). Assim, neste estudo, o espermatozoide de *F. brasiliensis* foi investigado, visando aumentar o conhecimento da ultraestrutura de espermatozoide e seu significado evolutivo para a morfologia em camarões semelhantes à peneídeos. Apesar de Ma *et al.* (2009) sugerirem a divisão de Penaeidae em três famílias distintas, no presente estudo esses táxons serão referidos com os nomes das tribos (Peneini, Parapeneini e Trachypeneini) de acordo com a visão tradicional.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Origem dos animais e coleta do material biológico***

Reprodutores de *F. brasiliensis* (n = 300) foram capturados no litoral de Santa Catarina (26°54'S 48°34'W) e transferidos via rodoviária para a EMA-FURG. No laboratório, quatro machos ( $27,74 \pm 3,93$  g) no estágio de intermuda foram selecionados da população de reprodutores capturados. Os espermátóforos de cada macho foram manualmente extrusados por meio da compressão da região lateroventral, posterior à inserção do quinto par de pereópodes (Nakayama *et al.* 2008).

Um dos espermátóforos de cada macho foi selecionado aleatoriamente e seccionado transversalmente ao meio com o auxílio de um bisturi, sendo o outro mantido inteiro. Os espermátóforos foram fixados em 1:1:1 de glutaraldeído 6%, paraformaldeído 6% e cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2). As amostras foram transferidas para o Laboratório de Imunologia e Microscopia Eletrônica, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Pelotas, RS.

### ***Microscopia eletrônica***

As amostras foram lavadas em 1 mL de solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 M e sacarose 0,2 M durante 15 minutos por três vezes. Elas foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) a 1% (1:1 solução de tetróxido de ósmio a 2% e cacodilato de sódio 0,4 M) durante três horas a 4°C e, posteriormente, lavadas em água bidestilada durante 15 minutos por duas vezes. As amostras foram, então, desidratadas em soluções de etanol com concentrações crescentes (30%, 50%, 70%, 90% e 100%).

Para microscopia de varredura (MEV), após a desidratação, metade os espermátóforos foram secos no aparelho de ponto crítico (Emitech K 850), montados em suportes porta-amostra de cobre (“stubs”) e banhados em prata líquida para permitir

a condução dos elétrons. Após a secagem a 26°C, as amostras foram levadas ao metalizador (Emitech K 550) para cobertura com camada condutora superficial em ouro. Por fim, as amostras foram observadas no microscópio Zeiss DSM 940 A.

Para microscopia eletrônica de transmissão (MET), após a desidratação, a outra metade dos espermatóforos foi imersa em acetona durante 10 minutos por três vezes e corada em azul de metileno 1% e bórax 1% ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ). Subsequentemente, as amostras permaneceram em solução 1:1 de resina epóxi (Epon 812) e acetona durante uma hora à temperatura ambiente sob agitação. Os espermatóforos foram posteriormente impregnados em resina durante uma hora sob agitação e, então, emblocados. Cortes semifinos (100 nm) foram realizados em ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT) e montados em porta-amostra de cobre. Por fim, os cortes foram observados em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 900).

As medidas dos espermatozoides (média  $\pm$  desvio padrão) foram expressas em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ). Quinze ( $n = 15$ ) espermatozoides foram medidos para estimar a morfometria dos espermatozoides de *F. brasiliensis*.

### ***Polarização e distribuição dos caracteres dos espermatozoides***

Quinze caracteres foram considerados neste estudo, os quais estão discriminados na Tabela 2.1. A polarização dos caracteres dentro da linhagem de camarões semelhantes à peneídeos foi baseada nos princípios de sistemática filogenética e na comparação com grupos externos, constituídos de três espécies de Solenoceridae e quatro de Aristeidae (linhagem de camarões semelhantes à aristeídeos). A distribuição dos caracteres foi baseada nos resultados deste estudo para *F. brasiliensis* e em descrições do espermatozoide disponíveis na literatura para 18 espécies de camarões semelhantes à peneídeos e para as sete espécies dos grupos externos (Tab. 2.2).

Tabela 2.1: Caracteres dos espermatozoides considerados no presente estudo, sua polarização na linhagem de camarões semelhantes à peneídeos e códigos usados para elaborar a Tabela 2.2.

Nº	Caracteres	Plesiomórficas	Apomórficas
<b>Configuração geral</b>			
1	Forma do acrosoma	Com espinho (0)	Esférico (1) Ausente (2)
2	Forma do corpo principal	Esférico (0)	Abaulado (1) Alongado (2)
3	Comprimentos do corpo principal e espinho	Proporcionais (0)	Desproporcionais (1)
<b>Citoplasma</b>			
4	Localização do citoplasma	Ao redor do pró-núcleo (0)	Ao redor do pró-núcleo, mas também no capuz e em partes do espinho (1) Forma de colar entre acrossoma e pró-núcleo (2)
5	Organelas	Ausentes (0)	Presentes (1)
<b>Pró-núcleo</b>			
6	Cromatina	Não condensada (0)	Condensada (1)
7	Envoltório nuclear	Ausente (0)	Presente (1)
<b>Região acrossômica</b>			
8	Complexidade	Zoneada (0)	Não zoneada (1)
9	Concavidade do capuz acrossômico	Côncavo (0)	Não côncavo (1)
10	Simetria do capuz acrossômico	Simétrico (0)	Assimétrico (1)
11	Protuberância lateral do capuz acrossômico	Ausente (0)	Presente (1)
12	Complexidade da região subacrossômica	Simples (0)	Complexo (1)
<b>Espinho</b>			
13	Espinho defletido do eixo principal do corpo	Não defletido (0)	Defletido (1)
14	Morfologia externa do espinho	Liso (0)	Marcado externamente por granulos na ponta (1) Uma linha em espiral (2) Espiralado (3)
15	Filamentos longitudinais	Presentes (0)	Ausentes (1)

Tabela 2.2: Distribuição dos caracteres dos espermatozoides nos camarões semelhantes à peneídeos e grupos externos.

Espécies	Caracteres					Fontes bibliográficas
	1-3	4-5	6-7	8-12	13-15	
<b>Penaeoidea</b>						
<b>Camarões semelhantes à peneídeos</b>						
<b>Penaeidae</b>						
<b>Parapeneini</b>						
<i>Artemesia longinaris</i> Spence Bate, 1888	010	00	00	00010	000	Scelzo & Medina (2003)
<i>Parapenaeus longirostris</i> (Lucas, 1846)	010	00	00	00010	011	Medina (1994)
<i>Penaeopsis serrata</i> Spence Bate, 1881	010	00	00	00010	000	Medina <i>et al.</i> (1994a)
<b>Peneini</b>						
<i>Farfantepenaeus brasiliensis</i> (Latreille, 1987)	000	00	00	00000	000	Este estudo
<i>Farfantepenaeus paulensis</i> (Pérez Farfante, 1967)	000	00	00	00000	000	Braga <i>et al.</i> (2013b)
<i>Fenneropenaeus chinensis</i> (Osbeck, 1765)	000	00	00	00000	0??	Kang <i>et al.</i> (2008)
<i>Fenneropenaeus indicus</i> (H. Milne Edwards, 1837)	000	00	00	00000	0??	Mohamed & Diwan (1993)
<i>Litopenaeus occidentalis</i> (Streets, 1871)	000	00	00	00000	00?	Alfaro <i>et al.</i> (2003); Alfaro <i>et al.</i> (2007)
<i>Litopenaeus schmitti</i> (Burkenroad, 1936)	000	00	00	00000	000	Fernandes (2013)
<i>Litopenaeus stylirostris</i> (Stimpson, 1871)	000	00	00	00000	0??	Alfaro <i>et al.</i> (2007)
<i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone, 1931)	000	00	00	00000	020	Alfaro <i>et al.</i> (2007); Aungsuchawan <i>et al.</i> (2011); Dougherty & Dougherty (1989)
<i>Marsupenaeus japonicus</i> (Spence Bate, 1888)	000	00	00	00000	000	Medina <i>et al.</i> (1994b)
<i>Penaeus kerathurus</i> (Forskål, 1775)	000	00	00	00000	001	Medina <i>et al.</i> (1994b)
<i>Penaeus monodon</i> Fabricius, 1798	000	00	00	00000	00?	Pongtippatee <i>et al.</i> (2007)
<b>Trachypeneini</b>						
<i>Trachypenaeus byrdi</i> Burkenroad, 1934	021	??	??	?????	10?	Alfaro <i>et al.</i> (2003)
<i>Trachypenaeus similis</i> (Smith, 1885)	021	??	??	?????	10?	Bauer & Min (1993)
<i>Xiphopenaeus riveti</i> Bouvier, 1907	021	??	??	?????	10?	Alfaro <i>et al.</i> (2003)
<b>Sicyoniidae</b>						
<i>Sicyonia carinata</i> (Brünnich, 1768)	000	00	00	00001	001	Medina <i>et al.</i> (1994a)
<i>Sicyonia ingentis</i> (Burkenroad, 1938)	000	00	00	00001	031	Clark & Griffin (1988)
<b>Camarões semelhantes à aristeídeos (grupos externos)</b>						
<b>Solenoceridae</b>						
<i>Solenocera africana</i> Stebbing, 1917	000	10	00	01100	000	Medina <i>et al.</i> (2006b)
<i>Solenocera membranacea</i> (Risso, 1816)	000	10	00	01100	000	Medina <i>et al.</i> (2006b)
<i>Pleoticus muelleri</i> (Spence Bate, 1888)	000	10	00	01100	000	Medina <i>et al.</i> (2006b)
<b>Aristeidae</b>						
<i>Aristeus antennatus</i> (Risso, 1816)	10-	20	00	0----	---	Medina (1995b)
<i>Aristeus varidens</i> (Holthuis, 1952)	10-	20	00	0----	---	Medina <i>et al.</i> (2006a)
<i>Aristaeomorpha foliacea</i> (Risso, 1827)	20-	00	00	-----	---	Medina <i>et al.</i> (2006a)
<i>Aristaeopsis edwardsiana</i> (Johnson, 1867)	20-	00	00	-----	---	Medina (1995b)

Interrogação (?) indica falta de dado e dígito (-) indica caráter não aplicável ao tipo de espermatozoide.



## RESULTADOS

### *Configuração geral*

Os espermatozoides de *F. brasiliensis* estão agrupados, internamente no espermatóforo, em uma densa massa espermática embebida em uma matriz extracelular que preenche os espaços entre os espermatozoides, formando um molde em volta de cada célula (Fig. 2.2A-D). O espermatozoide é ultraestruturalmente dividido em duas regiões: um corpo principal e um espinho (Fig. 2.3A). O corpo principal é esférico (Fig. 2.2E-F) e composto pelo citoplasma, pró-núcleo e a base da região acrossômica (Fig. 2.3A, C). O espinho é uma ultraestrutura projetada anteriormente a partir da região acrossômica (Fig. 2.3A-B). Os espermatozoides têm comprimentos do corpo principal e do espinho proporcionais, medindo  $8,57 \pm 1 \mu\text{m}$  no comprimento total,  $4,86 \pm 0,53 \mu\text{m}$  no diâmetro do corpo e  $4,32 \pm 0,63 \mu\text{m}$  no comprimento do espinho.

### *Citoplasma*

O citoplasma de *F. brasiliensis* é uma fina camada que circunda posteriormente a região pró-nuclear até a região acrossômica. O citoplasma é composto por membranas acumuladas e várias vesículas (Fig. 2.3C, E-F). Nenhuma organela foi observada no citoplasma de *F. brasiliensis*.

### *Pró-núcleo*

O pró-núcleo do espermatozoide de *F. brasiliensis* é centralizado e esférico. Essa região corresponde a quase toda área do corpo principal e não é limitada pelo envoltório pró-nuclear. O pró-núcleo apresenta um padrão fibroso devido à presença de grânulos e filamentos entrelaçados (Fig. 2.3A-C, E). Corpos densos embebidos na região pró-nuclear são observados em alguns espermatozoides (Fig. 2.3A).

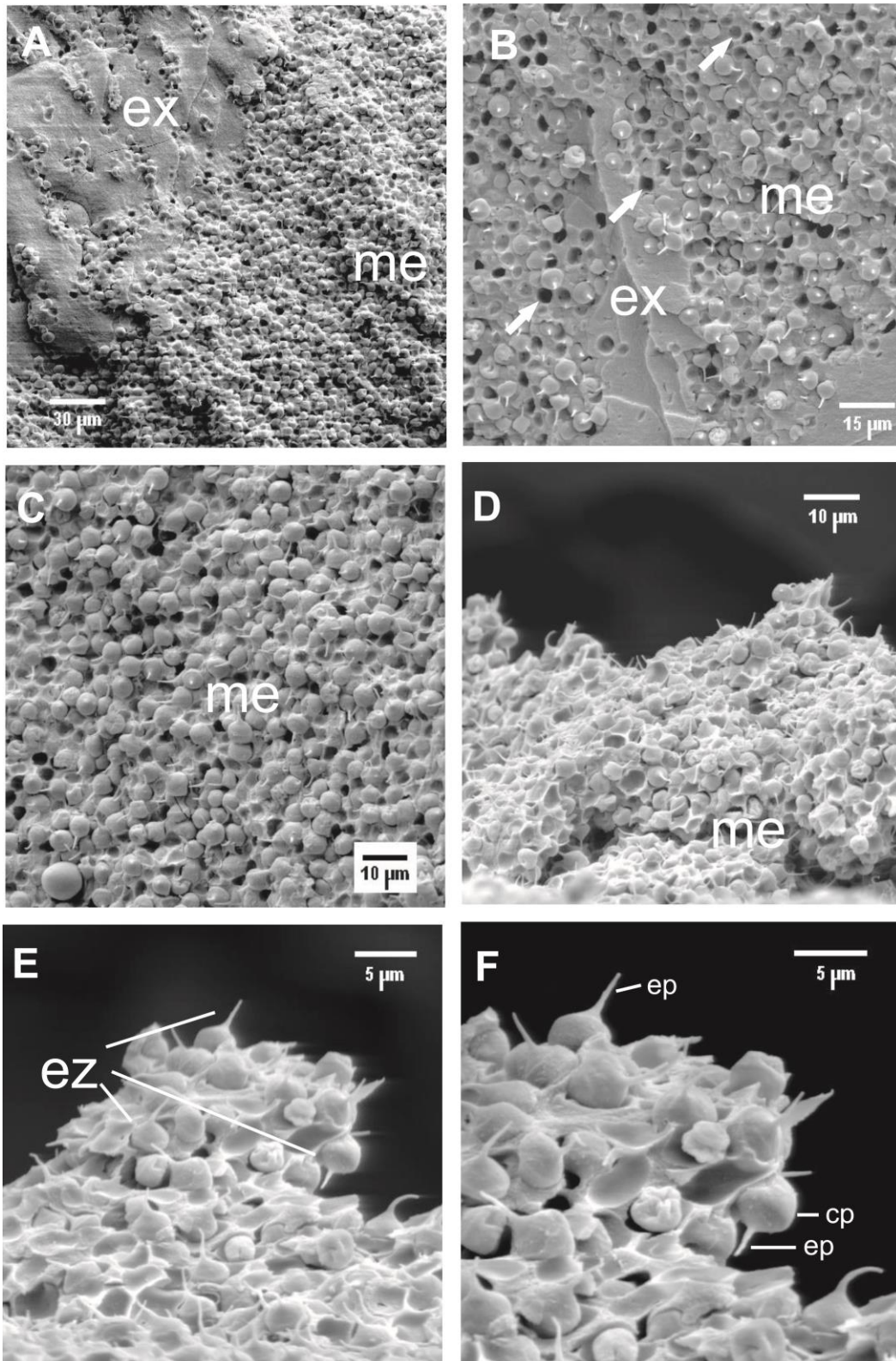


Figura 2.2: Massa espermática contida no espermatóforo de *Farfantepenaeus brasiliensis*. (A-B) Densa massa espermática (me) embebida em uma matriz extracelular (ex), formando um molde de cada célula (setas). (C-D) Detalhe da massa espermática. (E) Detalhe do padrão externo dos espermatozoides (ez). (F) Divisão do espermatozoide em corpo principal (cp) e espinho (ep).

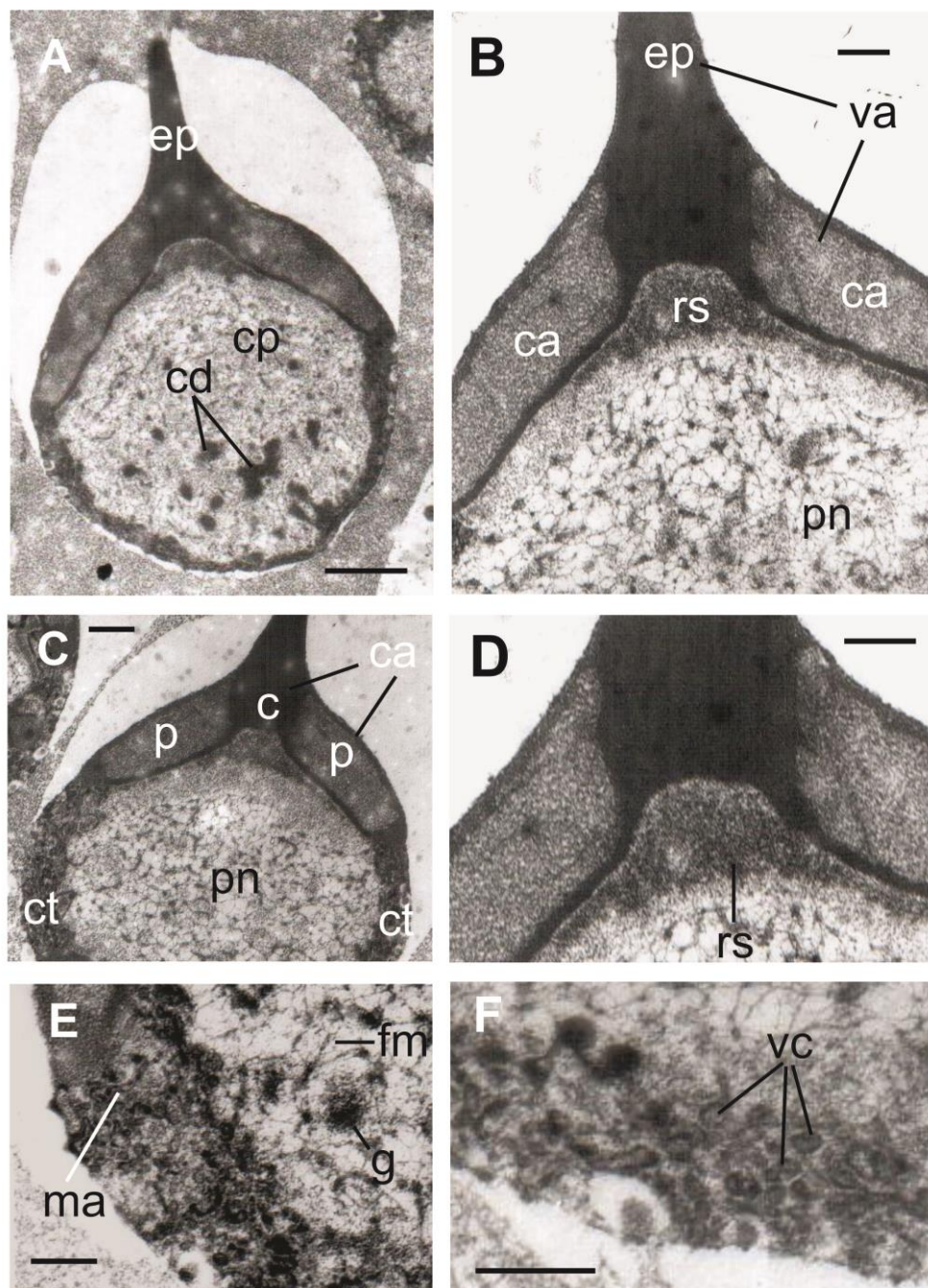


Figura 2.3: Ultraestrutura do espermatozoide de *Farfantepenaeus brasiliensis*. (A) espermatozoide dividido em corpo principal (cp) e espinho (ep), apresentando corpos densos (cd) embebidos na região pró-nuclear. (B) região acrossômica dividida em região subacrossômica (rs) e vesícula acrossômica (va), a qual é zoneada em capuz acrossômico (ca) e espinho. (C) Divisão do capuz acrossômico em duas regiões periféricas (p) e uma central (c), mostrando ainda o citoplasma (ct) circundando o pró-núcleo (pn). (D) Detalhe da região subacrossômica. (E) Grânulos (g) e filamentos (fm) no pró-núcleo e as membranas acumuladas (ma) no citoplasma. (F) Vesículas citoplasmáticas (vc). Barras: A, 1,1  $\mu\text{m}$ ; C, 0,6  $\mu\text{m}$ ; B, D, E e F, 0,4  $\mu\text{m}$ .

### ***Região acrossômica***

A região acrossômica do espermatozoide de *F. brasiliensis* é localizada anteriormente ao pró-núcleo e é zoneada em uma região subacrossômica e uma vesícula acrossômica (Fig. 2.3B-D). A região subacrossômica é localizada entre o pró-núcleo e a vesícula acrossômica e é ultraestruturalmente composta por material floculado denso (Fig. 2.3B, D). A divisão da região acrossômica continua com a subdivisão da vesícula acrossômica em capuz acrossômico e o espinho (Fig. 2.3B). O capuz acrossômico em *F. brasiliensis* é internamente côncavo e consiste de duas regiões periféricas, as quais são compostas de grânulos densos dentro de uma matriz translúcida, e um centro mais denso do qual o espinho é projetado (Fig. 2.3C).

### ***Espinho***

O espinho de *F. brasiliensis* é usualmente ereto ao eixo do corpo principal e é liso externamente (Fig. 2.2E-F). Ultraestruturalmente, o espinho é homogêneo e é composto por material filamentososo ao longo de sua extensão (Fig. 2.3B).

### ***Polarização e distribuição dos caracteres do espermatozoide***

A polarização dos 15 caracteres do espermatozoide de camarões semelhantes à peneídeos sugerida no presente estudo está discriminada na Tabela 2.1. A distribuição desses caracteres para camarões semelhantes à peneídeos e aristeídeos resultante da análise das espécies consideradas no presente estudo está demonstrada na Tabela 2.2. Todos os caracteres apresentados por *F. brasiliensis* foram plesiomórficos para a linhagem de camarões semelhantes à peneídeos (Tab. 2.2).

## DISCUSSÃO

### *Configuração geral*

O arranjo dos espermatozoides no espermatóforo caracterizado pela densa massa espermática em meio a uma matriz seminal tem sido previamente observado para várias espécies de camarões, incluindo *F. paulensis* (Dougherty *et al.* 1986, Bauer & Cash 1991, Braga *et al.* 2013b). O espermatozoide uniestrelado de *F. brasiliensis*, como esperado, é bastante similar ao de *F. paulensis* e, conseqüentemente, congruente com o padrão morfológico observado em camarões semelhantes à peneídeos (Braga *et al.* 2013a, b). Porém, a presença de espinho é compartilhada com Solenoceridae e as infraordens pleociematas Procarididea e Caridea (Felgenhauer *et al.* 1998, Medina *et al.* 2006b). Alguns autores têm sugerido que os espinhos de Dendrobranchiata e Pleocyemata seriam resultantes de evolução convergente, uma vez que não são estruturas homólogas (Medina 1995a, Jamieson & Tudge 2000, Braga *et al.* 2013a). Para a linhagem de camarões semelhantes à peneídeos, é sugerido, neste estudo, que a presença de um espinho acrossômico é plesiomórfica (Tab. 2.1), pois esta estrutura parece homóloga aquela observada em Solenoceridade, pertencente à outra linhagem evolutiva de Penaeoidea.

O espinho compartilhado pelas diferentes linhagens de Penaeoidea desempenha importante papel durante a fertilização. Este processo é iniciado pelo reconhecimento do ovócito pelo espermatozoide, quando, eles se aderem à membrana externa do ovócito pela ponta do espinho (Clark *et al.* 1981, Wikramanayake & Clark 1994). O contato inicial é facilitado pela afinidade de receptores presentes na ponta do espinho com ligantes específicos do envelope vitelínico do ovócito (Chen *et al.* 1994).

O corpo principal do espermatozoide de *F. brasiliensis* é esférico e composto pelo citoplasma, núcleo e a região basal da região acrossômica. A divisão do corpo

principal nestas três regiões é também observada em todos os outros camarões semelhantes à peneídeos (Kleve *et al.* 1980, Scelzo & Medina 2003, Kang *et al.* 2008, por exemplo). Contudo, a forma do corpo principal é um caráter interessante para analisar evolutivamente a morfologia do espermatozoide de camarões semelhantes à peneídeos. Sicyoniidae tem um corpo esférico, enquanto uma variação marcante do padrão morfológico é observada em Penaeidae. Para Peneini, incluindo *F. brasiliensis*, o corpo é esférico assim como observado em sicionídeos (Clark & Griffin 1988, Mohamed & Diwan 1993, Medina *et al.* 1994a, b). No entanto, em Parapeneini e Trachypeneini, os corpos são abaulados e alongados, respectivamente (Alfaro *et al.* 2003, Scelzo & Medina 2003). Nos grupos externos, em Solenoceridae e mesmo em Aristeidae, cujo espermatozoide é desprovido de espinho, o corpo principal também é esférico (Medina 1995b, Medina *et al.* 2006a, b). Assim, é possível inferir que o padrão esférico é provavelmente simplesiomórfico para camarões semelhantes à peneídeos.

A morfometria dos espermatozoides é outra característica que poderia ter maior utilidade em análises evolutivas da morfologia. No entanto, este caráter é usualmente negligenciado em estudos sobre ultraestrutura do espermatozoide, o que resulta em uma lacuna de informações na literatura. Por exemplo, Braga *et al.* (2013a) listaram as 37 espécies com espermatozoides uniestrelados atualmente estudados, incluindo Pleocyemata e Dendrobranchiata. Dentre essas espécies, somente 23 têm alguma informação morfométrica disponível. Entretanto, na maioria dos casos, o número de observações realizadas para a medição das células não é indicado. As medidas dos espermatozoides devem ser estimadas pela observação de mais de uma célula porque estes estão sujeitos a anormalidades morfológicas, como encurtamento ou ausência do espinho (Dougherty & Dougherty 1989). Nessas condições, tem sido sugerido que o espermatozoide seria incapaz de se fixar na membrana do ovócito (Wang *et al.* 1995).

Mesmo com a falta de informações, é possível analisar a evolução das medidas dos espermatozoides entre os camarões semelhantes à peneídeos. Por exemplo, o espermatozoide de *F. brasiliensis* tem comprimentos do espinho e do corpo principal proporcionais, assim como é observado para os demais camarões semelhantes à peneídeos, exceto Trachypeneini (veja Tabs. 2.1 e 2.2). Nesta tribo, o corpo principal é duas a três vezes maior do que o espinho. Assim, essa condição é provavelmente apomórfica para a linhagem de camarões semelhantes à peneídeos e relacionada ao alongamento do corpo principal observada em Trachypeneini (Alfaro *et al.* 2003).

### ***Citoplasma***

O citoplasma do espermatozoide de *F. brasiliensis* é localizado na borda posterior da célula, circundando o pró-núcleo. Essa estrutura é uma camada composta por um complexo de membrana que consiste de membranas acumuladas e várias vesículas. Uma aparente diferença parece ocorrer entre *F. paulensis* e *F. brasiliensis*. Na primeira, dois tipos de vesícula foram descritas no citoplasma, pequenas e grandes (Braga *et al.* 2013b). As vesículas grandes não foram observadas em *F. brasiliensis* no presente estudo. O padrão observado para *F. paulensis* também foi descrito para outros dendrobranquiatas (Medina 1994, Medina *et al.* 1994a, b, Scelzo & Medina 2003). Apesar dessa diferença, é provável que a origem do complexo de membranas que compõem o citoplasma de *F. brasiliensis* seja o mesmo que dos outros uniestrelados. Assim, as membranas acumuladas seriam derivadas da degeneração das organelas durante a espermatogênese e resíduos do envoltório nuclear, enquanto as vesículas derivadas principalmente das organelas (Medina *et al.* 1994a, b, Kang *et al.* 2008).

A localização do citoplasma ao redor do pró-núcleo é compartilhada por todos os camarões semelhantes à peneídeos (Tab. 2.2). Entre os camarões semelhantes à

aristeídeos, o citoplasma em forma de fina camada ao redor do pró-núcleo também é observado em Solenoceridae. Contudo, nessa família, o citoplasma pode estar presente simultaneamente no capuz acrossômico anterior ou em partes do espinho (Medina *et al.* 2006b). Em contrapartida, em alguns aristeídeos, o citoplasma circunda o pró-núcleo como em camarões semelhantes à peneídeos (Medina 1995b, Medina *et al.* 2006a). Desta forma, é possível inferir que a localização do citoplasma ao redor da região pró-nuclear é uma simplesiomorfia de camarões semelhantes à peneídeos.

Organelas não foram observadas na camada citoplasmática de *F. brasiliensis*. A ausência de organelas é compartilhada por todas as espécies de camarões semelhantes à peneídeos e à aristeídeos considerados no presente estudo (Tab. 2.2). Em Dendrobranchiata, a presença de organelas foi descrita apenas para o espermatozoide de *P. petrunkevitchi* (Sergestoidea), o qual possui um par de centríolos na base do acrossoma (Scelzo & Medina 2004). Portanto, a ausência de organelas no citoplasma seria outra condição simplesiomórfica para camarões semelhantes à peneídeos.

### ***Pró-núcleo***

A região pró-nuclear em *F. brasiliensis* não é limitada pelo envoltório nuclear e é composto de cromatina não condensada, o que atribui um padrão fibroso à região como resultado do entrelaçamento de filamentos e grânulos. A ausência do envoltório nuclear e a cromatina não condensada parecem ser caracteres altamente conservativos entre decápodes (Jamieson 1991, Jamieson & Tudge 2000, Tudge 2009). Padrão diferente deste é observado apenas fora de Crustacea. Por exemplo, em Hexapoda, a cromatina é condensada na região centro do pró-núcleo (Dallai *et al.* 2010a, b).

O padrão morfológico do pró-núcleo está diretamente relacionado à fertilização de Dendrobranchiata. Nesse grupo, a fertilização envolve uma reação acrossômica (RA)



visível, a qual é caracterizada pela exocitose do conteúdo celular no final do processo. Durante a exocitose, as características do pró-núcleo compartilhadas por dendrobranquiatas parece facilitar o transporte do material genético do espermatozoide para a superfície do ovócito. Isto porque, a cromatina não condensada possui maior elasticidade do que quando condensada e a ausência do envoltório nuclear representa a ausência de uma barreira para a eversão do conteúdo celular (Shigekawa & Clark 1986).

Em alguns espermatozoides de *F. brasiliensis* foram observados corpos densos intranucleares. Alguns autores descrevem a presença de corpos densos e/ou semelhantes a gotas de lipídios embebidos na região pró-nuclear, como em *Aristeus antennatus* (Risso, 1816), *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846), *Penaeus kerathurus* (Forskål, 1775) e *Pleoticus muelleri* (Spence Bate, 1888) (Medina 1994, 1995b, Medina *et al.* 1994b, 2006a). Segundo Medina (1994), esses corpos são derivados da degeneração da membrana do citoplasma e/ou envoltório nuclear que permanecem após a espermatogênese (Medina 1994). Contudo, este não parece ser um bom caráter para avaliar a evolução da morfologia, pois os corpos densos podem estar ausentes ou presentes em uma mesma espécie, como observado neste estudo (veja Figs. 2.3A e C).

### ***Região acrossômica***

O espermatozoide de *F. brasiliensis* possui a região acrossômica dividida em: uma simples região subacrossômica composta por material floculado; e uma vesícula acrossômica subdividida em um capuz acrossômico côncavo e simétrico lateralmente e o espinho. Este padrão de região acrossômica zoneada é similar ao observado para todos os dendrobranquiatas com acrossoma previamente estudados (Tab. 2.2). Mesmo em *Aristeus*, cujo acrossoma é esférico, possui a região dividida em diferentes zonas (Medina

1995a, Medina *et al.* 2006a). Desta forma, a região acrossômica zoneada parece ser uma condição simplésiômórfica para camarões semelhantes á peneídeos.

O capuz acrossômico côncavo e simétrico observado em *F. brasiliensis* também parece ser uma simplésiomorfia de camarões semelhantes à peneídeos. Essa hipótese é corroborada pelo fato de condição diferente só ser observada em grupos externos. Por exemplo, o espermatozoide de Solenoceridae possui capuz acrossômico assimétrico lateralmente (Medina *et al.* 2006b). Em relação à concavidade, somente o gênero *Solenocera* possui um capuz acrossômico não côncavo dentre os espermatozoides uniestrelados de Penaeoidea (Tab. 2.2). *Pleoticus* possui capuz acrossômico mais côncavo do que *Solenocera* (Medina *et al.* 2006b).

Um caráter relacionado à região acrossômica bem descrito e aplicado a estudos filogenéticos é a presença de uma protuberância lateral no capuz acrossômico em Parapeneini (Medina 1994, 1995a, Medina *et al.* 1994a, Scelzo & Medina 2003). Essa protuberância marca externamente o espermatozoide, resultando no abaulamento do corpo principal. Essa condição tem sido polarizada como apomorfia de Parapeneini e tem sido usada para corroborar a monofilia da tribo (Medina *et al.* 1994a, Scelzo & Medina 2003). Em Solenoceridae, a protuberância lateral também está ausente (Medina *et al.* 2006b). Assim, a condição ausência da protuberância, como observada em *F. brasiliensis*, é provavelmente uma plesiomorfia de camarões semelhantes à peneídeos.

Como previamente mencionado, a região subacrossômica do espermatozoide de *F. brasiliensis* é uma ultraestrutura simples composta por material floculado. Padrão compartilhado por todos Parapeneini e Peneini estudados (Tab. 2.2). Sicyoniidae possui a região subacrossômica mais complexa em relação aos demais camarões semelhantes à peneídeos. Esta região é dividida em reticulado cristalino, região central granular, disco em forma de pires e corpos esféricos localizados no centro granular (Kleve *et al.* 1980,

Clark & Griffin 1988). Em Solenoceridae, a região subacrossômica é similar àquela de Parapeneini e Peneini (Medina *et al.* 2006b), o que sugere que a condição simples é plesiomórfica para camarões semelhantes à peneídeos. Esta hipótese tem uma importante consequência para a análise da evolução da morfologia.

Alguns autores inicialmente sugeriram a relação entre Solenoceridae, Sicyoniidae e Penaeidae com base na presença do espinho acrossômico (Medina 1995a, Scelzo & Medina 2004, Medina *et al.* 2006a, b). Posteriormente, foi reconhecido o clado Sicyoniidae-Penaeidae devido o acrossoma simétrico (Medina 1995a). De forma semelhante, a relação entre Solenoceridae e Penaeidae foi sugerida com base na região subacrossômica simples (Scelzo & Medina 2004, Medina *et al.* 2006b). Outros autores justificaram que a limitação de informações impedia a inferência de conclusões confiáveis e, então, representaram as relações filogenéticas entre as famílias dendrobranquiatas com espermatozoides uniestrelados como uma politomia (Jamieson & Tudge 2000).

No entanto, a filogenia proposta por Ma *et al.* (2009) para Penaeoidea indica que Solenocerida-Sicyoniidae-Penaeidae seria parafilético, enquanto Solenoceridae-Penaeidae seria polifilético. Em contrapartida, o clado Sicyoniidae-Penaeidae sugerido por Medina (1995a) corresponde à linhagem de camarões semelhantes à peneídeos. Adicionalmente, segundo Ma *et al.* (2009), Sicyoniidae é a família mais derivada dentro dessa linhagem. Desta forma, se de fato a região subacrossômica de Penaeidae for plesiomórfica, a evolução da morfologia nesse caso ocorreu da condição simples para a complexa em camarões semelhantes à peneídeos.

A complexidade da região subacrossômica parece estar diretamente relacionada às diferenças observadas na RA das famílias de camarões semelhantes à peneídeos (Fig. 2.4). Por exemplo, para Sicyoniidae, a RA é um fenômeno bifásico

divido em: despolimerização do espinho seguida pela exocitose do acrossoma (fase 1); e a formação do filamento acrossômico (fase 2) (Griffin *et al.* 1988). Wikramanayake *et al.* (1992) sugerem que a região subacrossômica altamente complexa está associada a formação do filamento acrossômico. Para Peneini, a RA não envolve a formação do filamento acrossômico e consiste somente da despolimerização do espinho e exocitose do conteúdo celular (Pongtippatee *et al.* 2007, Kruevaisayawan *et al.* 2008). Nesse caso, o aumento de volume do material floculado durante o início da RA forçaria a vesícula acrossômica a romper a membrana, desencadeando a eversão do conteúdo celular (Alfaro *et al.* 2003, 2007, Pongtippatee *et al.* 2007). Essas informações são limitadas a poucas espécies e a RA é ainda desconhecida para as outras tribos e grupos externos, o que impede a análise da evolução da morfologia da RA e fertilização.

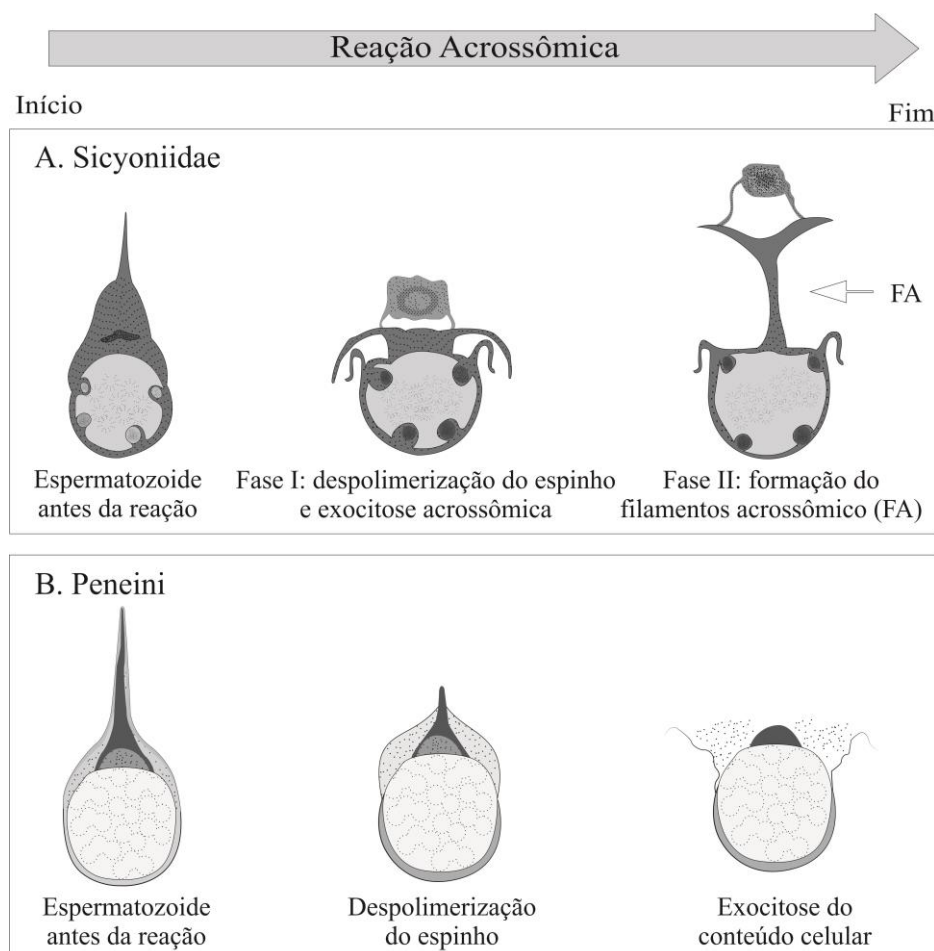


Figura 2.4: Tipos conhecidos de reação acrossômica de camarões semelhantes à peneídeos. (A) Sicyoniidae. (B) Peneini. (Modificado de Braga *et al.* 2013a).

### ***Espinho***

O espinho de *F. brasiliensis* é geralmente ereto, externamente liso e ultraestruturalmente composto por material filamentoso. Esse padrão é congruente com aquele observado para *F. paulensis* (Braga *et al.* 2013b). Contudo, diferenças marcantes são observadas entre camarões semelhantes à peneídeos. Por exemplo, em Trachypeneini, a base do espinho é defletida do eixo do corpo principal (Bauer & Min 1993, Alfaro *et al.* 2003). Essa condição não é observada em outros camarões semelhantes à peneídeos e em Solenoceridae. Desta forma, a condição não defletida seria plesiomórfica para camarões semelhantes à peneídeos.

Outro caráter do espinho considerado nesse estudo foi a morfologia da superfície externa. Em Parapeneini, *P. longirostris* possui o espinho marcado externamente por um material granular na ponta da estrutura. Em Peneini, uma única linha em espiral foi descrito para *L. vannamei* (Aungsuchawan *et al.* 2011). Em Sicyoniidae, *Sicyonia ingentis* (Burkenroad, 1938) tem espinho espiralado, enquanto *Sicyonia carinata* (Brünnich, 1768) tem espinho externamente liso (Clark & Griffin 1988, Medina *et al.* 1994a). A observação deste caráter requer MEV e a maioria dos estudos avalia o padrão morfológico somente por meio de MET. Apesar de dados limitados, é possível inferir a provável polarização desse caráter porque em Solenoceridae o espinho também é liso, como observado em *F. brasiliensis*. Desta forma, essa condição seria plesiomórfica para camarões semelhantes à peneídeos.

Ultraestruturalmente, os camarões semelhantes à peneídeos apresentam mais de um padrão morfológico de espinho. Em Parapeneini, *P. longirostris* possui material granular na ponta do espinho e material não granular, denso e homogêneo na base do mesmo (Medina 1994). Em Peneini, a maioria das espécies tem o espinho composto por material filamentoso homogêneo em sua extensão, como observado em *F. brasiliensis*

(Tab. 2.2). No entanto, em *P. kerathurus*, o espinho é inteiramente composto por material granular (Medina *et al.* 1994b). Ambas as espécies de sicionídeos estudadas também não apresentam material filamentosos no espinho (Kleve *et al.* 1980, Medina *et al.* 1994a). No grupo externo, todas as espécies de solenocerídeos estudadas tem a ultraestrutura do espinho semelhante àquela de Peneini (Medina *et al.* 2006b). Desta forma, o espinho filamentoso é provavelmente a condição plesiomórfica para camarões semelhantes à peneídeos. Adicionalmente, a presença de grânulos em espécies de Parapeneini (*P. longirostris*) e Peneini (*P. kerathurus*) pode ser uma homoplasia.

## CONCLUSÕES

Os caracteres observados no espermatozoide de *F. brasiliensis* são todos plesiomórficos para a linhagem de camarões semelhantes à peneídeos. Adicionalmente, o padrão morfológico para a espécie é congruente com o observado para Peneini. Os outros grupos monofiléticos que compõe a linhagem apresentam apomorfias. Em Parapeneini, o corpo principal é abaulado como resultado da protuberância lateral do capuz acrossômico. Em Trachypeneini, os comprimentos do corpo principal e do espinho são desproporcionais, devido ao alongamento do corpo. Além disso, a base do espinho é defletida do eixo do corpo principal. Em Sicyoniidae, o espermatozoide é esférico, assim como em Peneini, mas a região acrossômica é comparativamente mais complexa e o espinho não é composto por material filamentoso. Desta forma, o espermatozoide esférico com acrossoma simétrico e região subacrossômica simples observado em Peneini é provavelmente o padrão mais próximo daquele apresentado pelo ancestral comum exclusivo da linhagem de camarões semelhantes à peneídeos.

## **CAPÍTULO 3**

### **ULTRAESTRUTURA DA CAPACITAÇÃO DO ESPERMATOZOIDE DE**

*Farfantepenaeus paulensis*

## INTRODUÇÃO

O processo de capacitação do espermatozoide de Dendrobranchiata tem sido demonstrado experimentalmente *in vitro*. Por exemplo, quando espermatóforos são extrusados diretamente da ampola terminal, as taxas de fertilização *in vitro* são menores do que quando são usados espermatóforos que foram previamente estocados no tético (Bray & Lawrence 1992, Alfaro *et al.* 1993).

Outro método usualmente utilizado para demonstrar a capacitação é a indução da reação acrossômica *in vitro* (denominada de ativação do espermatozoide) por água de ovo (EW, sigla em inglês). A EW é um material floculado liberado durante a desova e é composta por material residual das camadas mais externas dos ovócitos, envelope vitelínico e outras substâncias do tético. A ativação dos espermatozoides ocorre quando as células entram em contato com a EW (Kruevaisayawan *et al.* 2008).

Alfaro *et al.* (2003) avaliaram a ativação dos espermatozoide contidos em espermatóforos coletados da ampola terminal de *Litopenaeus occidentalis* (Streets, 1871), *Trachypenaeus byrdi* Burkenroad, 1934 e *Xiphopenaeus riveti* Bouvier, 1907 usando EW. As taxas de ativação dos espermatozoides dessas espécies foram baixas ou nulas, demonstrando a falta de capacidade de fertilização da maioria das células quando não há estocagem do espermatóforo no tético (Alfaro *et al.* 2003). Resultados similares também foram observados em *L. vannamei*, *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1874) e *S. ingentis* (Wikramanayake *et al.* 1992, Alfaro *et al.* 2007).

As mudanças morfológicas associadas ao processo de capacitação após a estocagem do espermatóforo no tético têm sido identificadas por meio de estudos da ultraestrutura do espermatozoide. No entanto, descrições sobre a ultraestrutura da capacitação do espermatozoide em Dendrobranchiata estão restritas a *S. ingentis*, *L. vannamei*, *L. stylirostris* e *L. occidentalis* (Wikramanayake *et al.* 1992, Alfaro *et al.*



2007, Aungsuchawan *et al.* 2011). As limitadas informações disponíveis na literatura sobre a capacitação em camarões inviabilizam a melhor compreensão desse processo.

Como demonstrado nos dois capítulos anteriores, decápodes apresentam um enorme diversidade morfológica da ultraestrutura de espermatozoides. O mesmo é observado para processos reprodutivos, como capacitação, reação acrossômica e fertilização (Braga *et al.* 2013a). Assim, a investigação do maior número de espécies se faz necessária para identificação de padrões entre os grupos de decápodes.

Para *F. paulensis*, a ultraestrutura do espermatozoide foi previamente descrita (Braga *et al.* 2013b), porém a morfologia do processo de capacitação ainda é desconhecida. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar as mudanças ultraestruturais apresentadas pelos espermatozoides de *F. paulensis* após a estocagem do espermatóforo no télico. Este estudo corresponde à primeira descrição morfológica do processo de capacitação para o gênero *Farfantepenaeus*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Reprodutores de *F. paulensis* (n = 50) foram capturados no litoral de Santa Catarina e transferidos para o setor de Maturação e Desova da EMA-FURG. No laboratório, os animais foram aclimatados por uma semana em tanques circulares de 10 m<sup>2</sup> (5000 L). Neste período, os camarões foram alimentados com lula *Illex argentinus* (Castellanos 1960), siri *Callinectes sapidus* (Rathbun 1896), peixe *Macrodon ancylodon* (Bloch & Schneider 1801) e ração especialmente formulada para reprodutores de camarões (Breed'S, Inve Aquaculture, Bélgica) ofertados *ad libitum* alternadamente quatro vezes ao dia. Temperatura, salinidade e fotoperíodo foram mantidos em 27 ± 1°C, 30 ± 1 e 14 h de luz e 10 h de escuro. A taxa diária de renovação da água foi de 100%. Restos de alimentos, fezes e mudas foram removidos dos tanques diariamente.

Após a aclimação, as fêmeas foram abladadas unilateralmente. Após a ablação, as fêmeas foram mantidas sob as mesmas condições da aclimação. O estágio de maturação das fêmeas foi checado diariamente. As fêmeas com ovários maduros foram identificadas por exame visual com auxílio de uma lanterna a fim de iluminar a gônada em contraste com o fundo branco dos tanques de maturação (Peixoto *et al.* 2003). Fêmeas maduras e naturalmente copuladas ( $n = 8$ ;  $53,04 \pm 8,21$  g) foram identificadas, crioanestesiadas e dissecadas para obtenção do espermatóforo que estava estocado no tético. Oito machos ( $22,75 \pm 4,11$  g) no período de intermuda e sem aparente melanização dos espermatóforos foram selecionados entre os camarões do tanque de maturação. Os espermatóforos foram extrusados manualmente pela compressão manual do quinto par de pereópodes (Nakayama *et al.* 2008).

Todos espermatóforos foram fixados em 1:1:1 de glutaraldeído 6%, paraformaldeído 6% e cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) e, após 24 h a 4°C, foram transferidos para EMBRAPA (Pelotas, RS). A preparação das amostras e observação em MET seguiu a metodologia descrita no Capítulo 2. Os espermatozoides contidos nos espermatóforos coletados das ampolas terminais e dos téticos foram referidos no presente estudo como espermatozoides-A e -T, respectivamente.

## RESULTADOS

O padrão morfológico observado nos espermatozoides-A consistiu de um corpo principal composto do citoplasma, pró-núcleo e da região basal da região acrossômica, a partir da qual o espinho é projetado anteriormente (Fig. 3.1A). Esse padrão generalizado também foi observado nos espermatozoides-T (Fig. 3.1D).

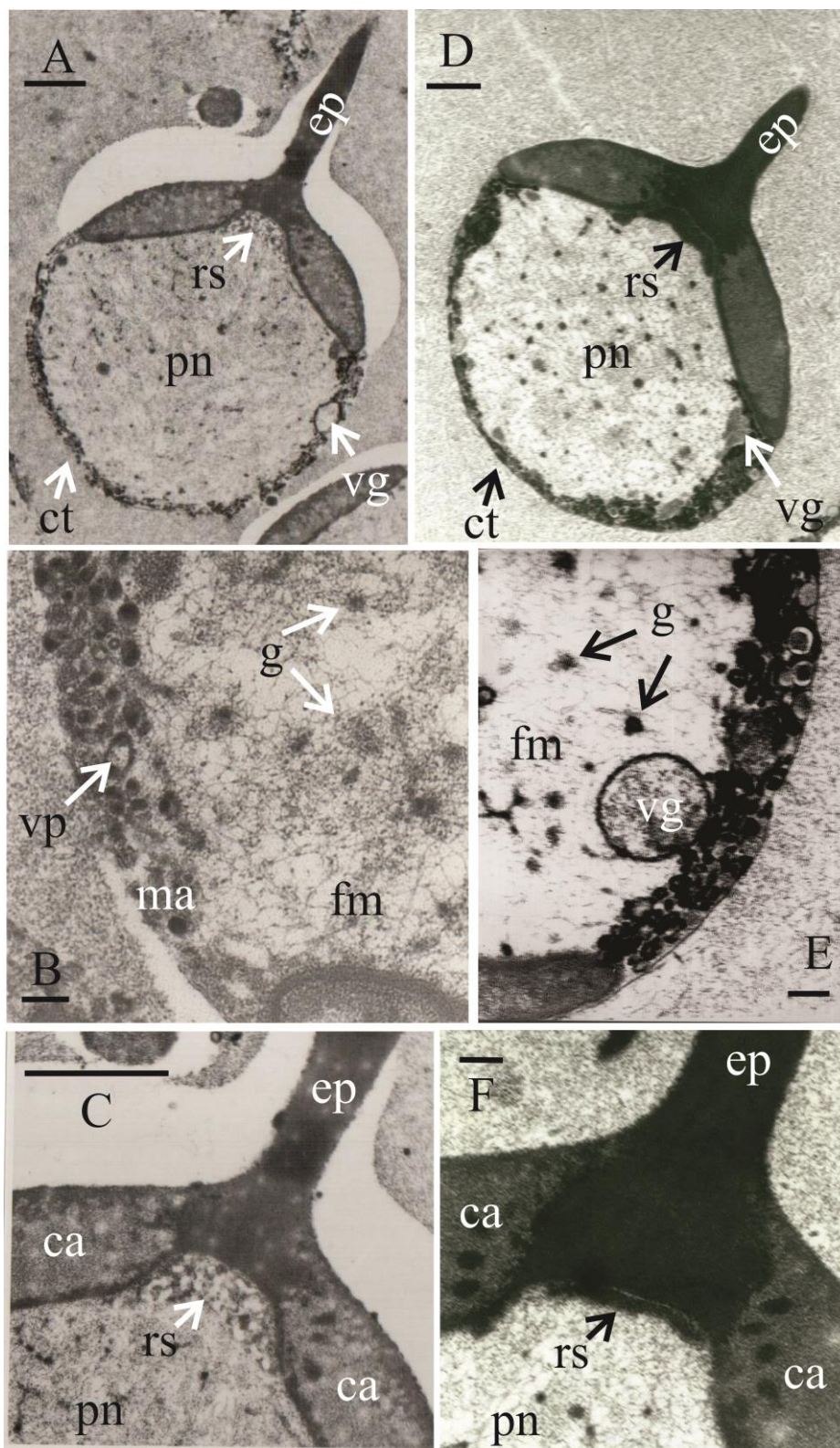


Figura 3.1: Comparação da ultraestrutura de espermatozoides coletados da ampola terminal (A-C) e do télcio (D-F) de *Farfantepenaeus paulensis*. ep: espinho; ct: citoplasma; ma: membranas acumuladas; vp: vesícula pequena; vg: vesícula grande; pn: pró-núcleo; g: grânulos; fm: filamentos; ca: capuz acrossômico; rs: região subacrossômica. Barras: A, B, 1,1  $\mu\text{m}$ ; C, 0,15  $\mu\text{m}$ ; D, 0,6  $\mu\text{m}$ ; E, F, 0,25  $\mu\text{m}$ .

Em espermatozoides-A e -T, o citoplasma foi observado como uma fina camada que circunda posteriormente o pró-núcleo e é limitado anteriormente pela região acrossômica. Adicionalmente, a camada citoplasmática em ambos os espermatozoides foi composta por membranas acumuladas e duas populações de vesículas, uma pequena e outra grande (Figs. 3.1B, E).

Diferenças ultraestruturais marcantes foram observadas nas regiões pró-nuclear e acrossômica entre espermatozoides-A e -T. O pró-núcleo de espermatozoides-A foi composto por cromatina não condensada com padrão fibroso devido a presença de uma rede de grânulos e filamentos (Fig. 3.1B). Esse padrão também foi observado em espermatozoides-T (Fig. 3.1E). No entanto, a cromatina em espermatozoides-T foi mais descondensada do que em espermatozoides-A, tornando a região pró-nuclear mais translúcida e os filamentos menos abundantes (Figs. 3.1B, E).

Na região acrossômica, a vesícula acrossômica (capuz acrossômico e espinho) foi composta por material mais denso em espermatozoides-T do que em espermatozoides-A. O capuz acrossômico em espermatozoides-T foi menos côncavo. A região subacrossômica, composta por material floculados em espermatozoides-A, foi mais estendida lateralmente e composta por material mais denso em espermatozoides-T do que em espermatozoides-A (Figs. 3.1A, C, D, F).

## **DISCUSSÃO**

O padrão morfológico dos espermatozoides-A de *F. paulensis* observado no presente estudo foi congruente com aquele previamente descrito para a espécie (Braga *et al.* 2013b). Entretanto, diferenças marcantes foram observadas nos espermatozoides após a estocagem do espermatóforo no télico. Essas diferenças estiveram principalmente relacionadas ao pró-núcleo e a região acrossômica dos espermatozoides-

T, tais como: (1) cromatina se torna mais descondensada, reduzindo a quantidade de filamentos; (2) a região acrossômica se torna mais densa; (3) o capuz acrossômico se torna menos côncavo; (4) a região subacrossômica perde sua característica floculada e se torna fortemente densa, estendendo-se lateralmente sob a superfície posterior da vesícula acrossômica.

Em *S. ingentis*, as mudanças morfológicas após a estocagem do espermátóforo no télico também estão associadas à vesícula acrossômica e a região subacrossômica. No entanto, essas mudanças são bem mais complexas do que as observadas para *F. paulensis* neste estudo. Por exemplo, os espermatozoides-T perdem o padrão espiralado do espinho característico da espécie e desenvolvem uma nova estrutura na região subacrossômica. Esta estrutura é chamada de “pires” estendido e tem forma cilíndrica, estendendo-se desde o disco em forma de pires até o reticulado cristalino (veja a discussão sobre região acrossômica do Capítulo 2 para revisão) (Wikramanayake *et al.* 1992).

Para peneídeos, três diferenças básicas entre espermatozoides-A e -T foram identificadas para espécies de *Litopenaeus*: (1) a região subacrossômica de espermatozoides-T apresenta denso material floculado em comparação com espermatozoides-A; (2) as fibras de cromatina no pró-núcleo de espermatozoides-T são mais descondensadas do que em espermatozoides-A; (3) uma linha espiral e uma circular basal observadas nas superfícies externas do espinho e do capuz acrossômico, respectivamente, de espermatozoides-A de *L. vannamei* são perdidas em espermatozoides-T (Alfaro *et al.* 2007, Aungsuchawan *et al.* 2011).

É possível observar que algumas das mudanças sofridas pelos espermatozoides de *F. paulensis* após a capacitação foram parecidas com aquelas descritas para *Litopenaeus* (1 e 2, conforme enumerado acima). Esta maior similaridade com

*Litopenaeus* do que com *S. ingentis* está diretamente relacionada às diferenças dos padrões morfológicos do espermatozoide e da reação acrossômica entre as famílias Sicyoniidae e Penaeidae.

Como comentado no Capítulo 2, Sicyoniidae tem a reação acrossômica caracterizada pela formação do filamento acrossômico. Wikramanayake *et al.* (1992) sugeriram que a nova estrutura formada nos espermatozoides-T atue como um suporte a partir do qual o filamento se estende anteriormente. Em contrapartida, em Penaeidae, a reação acrossômica não compreende a formação do filamento acrossômico e é caracterizada pela despolimerização do espinho e, subsequente, exocitose do material nuclear. Para os espermatozoides dessa família, é sabido que a região subacrossômica é a estrutura responsável pela exocitose do conteúdo celular. Durante a reação acrossômica, essa região se torna progressivamente mais densa e maior, forçando a ruptura da vesícula acrossômica (Alfaro *et al.* 2003, 2007, Pongtippatee *et al.* 2007). Desta forma, a mudança sofrida na região subacrossômica após a capacitação, tornando-se mais densa e estendida lateralmente à vesícula acrossômica, está provavelmente relacionado à sua função durante a reação acrossômica.

De forma semelhante, o padrão menos condensado das fibras de cromatina provavelmente está associado a eventos da reação acrossômica. Shigekawa & Clark (1986) sugerem que a cromatina não condensada possui maior elasticidade do que quando condensada, facilitando a eversão do conteúdo celular. Desta forma, provavelmente o pró-núcleo menos condensado em espermatozoides-T permite a exocitose ao final da reação acrossômica. A falta de informações sobre reação acrossômica para *F. paulensis* e sobre a capacitação para outras espécies de *Farfantepenaeus* impede, neste momento, uma discussão sobre as outras mudanças identificadas neste estudo.

As mudanças morfológicas descritas em espermatozoides capacitados são provavelmente respostas a mudanças iônicas e bioquímicas durante a estocagem do espermatóforo no télico (Wikramanayake *et al.* 1992). Por exemplo, aumento do pH interno e de  $\text{Ca}^{+2}$  têm sido demonstrado em espermatozoides capacitados de *S. ingentis* (Griffin *et al.* 1987, Lindsay & Clark 1992). Para *Penaeus monodon* Fabricius, 1798, diferentes perfis das proteínas e lipídios das membranas dos espermatozoides-A e -T foram demonstrados experimentalmente (Vanichviriyakit *et al.* 2004). Em adição, Vanichviriyakit *et al.* (2004) relatam o aumento sequencial na fosforilação da tirosina no espermatozoide de *P. monodon* durante a estocagem do espermatóforo no télico. Aungsuchawan *et al.* (2011) demonstraram que o local da fosforilação em *L. vannamei* muda do espinho em espermatozoides-A para a região subacrossômica em espermatozoides-T e relacionaram essa mudança bioquímica com a transformação do material que compõe a região subacrossômico.

## CONCLUSÕES

Após a estocagem do espermatóforo no télico, os espermatozoides de *F. paulensis* sofrem mudanças provavelmente relacionadas à sua capacitação. Os espermatozoides estocados no télico apresentam cromatina mais descondensada e região acrossômica mais densa, sendo o capuz acrossômico menos côncavo. A mudança morfológica mais marcante observada no presente estudo foi a perda da característica floculada da região subacrossômica, a qual se tornou fortemente densa e mais estendida lateralmente em espermatozoides capacitados.

## **CAPÍTULO 4**

### **REGENERAÇÃO DO ESPERMATÓFORO DE *Farfantepenaeus brasiliensis* E O EFEITO DA MUDA**



## INTRODUÇÃO

Em machos peneídeos, o sistema reprodutor é dividido em testículo e vaso deferente. O testículo é composto por lóbulos pareados e está localizado no meio do cefalotórax, entre o coração e o estômago. O vaso deferente inicia-se na porção posterior do testículo e segue até a base do quinto par de pereópodes. O vaso deferente é dividido em quatro regiões morfológicas distintas: proximal, média, distal e ampola terminal (Fig. 4.1) (Dall *et al.* 1990, Bray & Lawrence 1992).

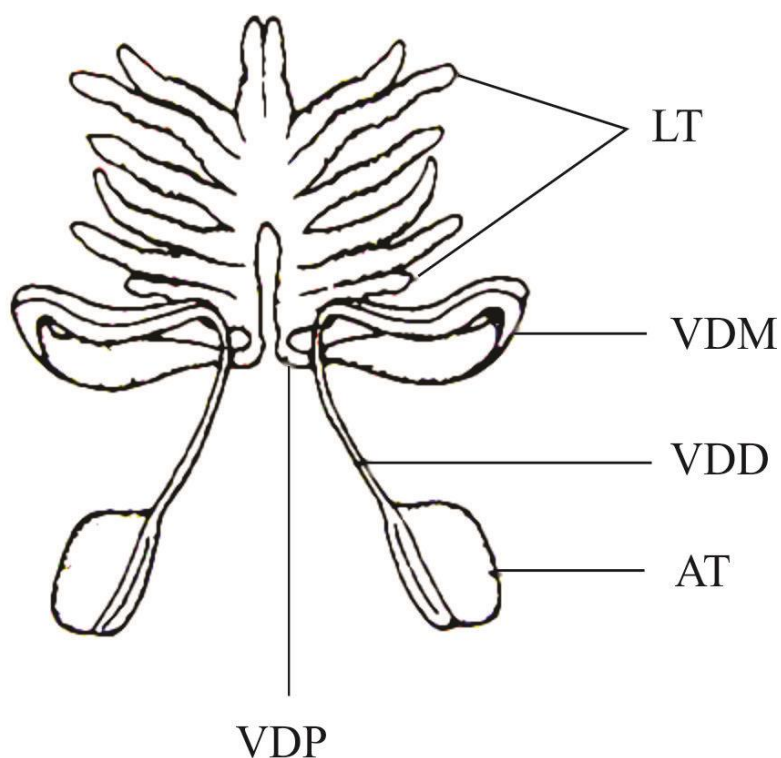


Figura 4.1: Sistema reprodutivo de machos de Penaeidae, mostrando a divisão em testículo e vaso deferente. LT: lóbulos do testículo; VDP: vaso deferente proximal; VDM: vaso deferente médio; VDD: vaso deferente distal; AT: ampola terminal. (Modificado de Dall *et al.* 1990).

No testículo, as células espermáticas iniciais são produzidas, tais como espermatogônias, espermatócitos e espermátides (King 1948, Medina 1994). Os espermatozoides são observados apenas no vaso deferente, sendo a formação do espinho iniciada no vaso deferente proximal (Dougherty & Dougherty 1989). Ao longo da passagem dos espermatozoides pelas diferentes regiões do vaso deferente, os mesmos são compactados e aglomerados em uma matriz seminal (Malek & Bawab 1974a). Ao atingir a ampola terminal, a matriz seminal é envolta por um número de camadas acelulares variável entre espécies, formando os espermatóforos (Bauer 1991, Chow *et al.* 1991). Durante a cópula, o macho, aparentemente com o auxílio do petasma, transfere o espermatóforo para a fêmea (Bauer & Cash 1991, Browdy 1992).

Os espermatóforos são estruturas que têm como principais funções proteger e evitar a perda de espermatozoides durante a transferência para as fêmeas. Adicionalmente, os espermatóforos lacram o téllico após a cópula, evitando a substituição do espermatóforo ou inseminação por outro macho (Bauer 1991, Subramoniam 1991). Relacionado à função de lacrar o téllico, os peneídeos possuem espermatóforos de diferentes complexidades (Fig. 4.2). Por exemplo, fêmeas de téllico aberto, exclusivo de *Litopenaeus* (dentro de Penaeidae), recebem espermatóforos complexos com estruturas acessórias que atuam selando externamente o téllico, como “asa” (Fig. 4.2A). Por outro lado, nos demais gêneros (de téllico fechado), os machos geralmente produzem espermatóforos mais simples e divididos em um corpo principal e um apêndice, o qual é a estrutura responsável por lacrar internamente o téllico (Fig. 4.2B) (Bauer 1991, Bauer & Cash 1991).

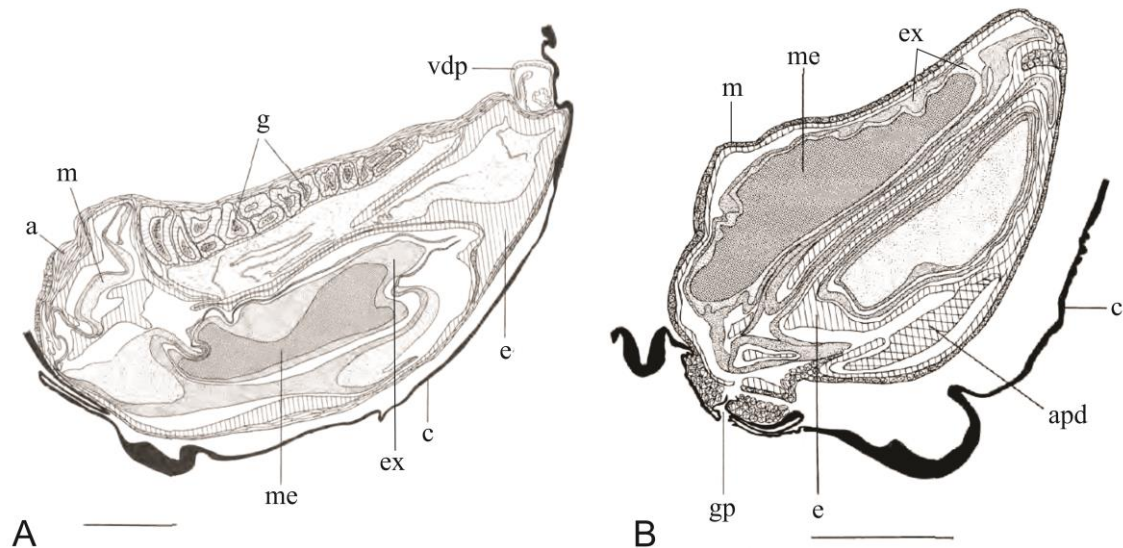


Figura 4.2: Diversidade dos espermatóforos de Penaeidae. Os cortes correspondem a espermatóforos contidos nas ampolas terminais. (A) *Litopenaeus*. (B) *Farfantepenaeus*. a: “asa”; m: músculo; g: glândulas; vdp: porção terminal do vaso deferente proximal; e: epitélio; c: cutícula; ex: matriz extracelular; me: massa espermática; apd: apêndice; gp: gonoporo. Barras: A = 1 mm; B = 2 mm. (Modificado de Bauer 1991).

Independentemente da complexidade, os espermatóforos de peneídeos são geralmente regenerados após a ejaculação devido à cópula ou extrusão (Malek & Bawab 1974a, b, Heitzmann *et al.* 1993). Alguns autores têm demonstrado que o tempo para a regeneração pode ser afetado por diferenças populacionais, temperatura, entre outros (Rosas *et al.* 1993, Pascual *et al.* 1998). Porém, estudos sobre o tempo de regeneração de espermatóforos de diferentes complexidades não estão disponíveis na literatura.

Em outros estudos têm sido demonstrado que a regeneração do espermatóforo de *L. vannamei* está intrinsicamente relacionado a muda (Heitzmann *et al.* 1993, Parnes *et al.* 2006). O processo da muda em crustáceos apresenta quatro estágios: intermuda, pré-muda, muda e pós-muda (Brusca & Brusca 2003). Para *L. vannamei*, os seguintes eventos de regeneração do espermatóforo durante os estágios da muda têm sido propostos: (1) na intermuda, um espermatóforo está presente em cada ampola terminal; (2) durante a pré-muda, o espermatóforo é degenerado por meio de processos de

degradação da matriz extracelular que o compõe e de fagocitose dos espermatozoides; (3) na muda, os espermatóforos estão ausentes; (4) na pós-muda, dois novos espermatóforos estão presentes, um em cada ampola terminal (Parnes *et al.* 2006).

Mecanismos da regeneração do espermatóforo têm sido frequentemente estudados em peneídeos com espermatóforos mais complexos, isto é, de *Litopenaeus* (Chow *et al.* 1991, Heitzmann *et al.* 1993, Rosas *et al.* 1993). Em contrapartida, os mecanismos da regeneração do espermatóforo de peneídeos com espermatóforos menos complexos, como *Farfantepenaeus* são desconhecidos, incluindo o tempo de formação após a ejaculação e o efeito da muda nesse processo. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a regeneração do espermatóforo de *F. brasiliensis*, analisando o efeito da muda nesse processo após a extrusão manual.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Origem dos animais e aclimação***

Reprodutores de *F. brasiliensis* (n = 300) foram coletados no litoral de Santa Catarina e foram transferidos para a EMA-FURG. No laboratório, os camarões foram estocados na densidade de sete camarões m<sup>-2</sup> em quatro tanques circulares de 10 m<sup>2</sup> de área de fundo (5000 L de volume útil). Durante uma semana, os reprodutores foram aclimatados as condições de laboratório. Nesse período, temperatura, salinidade e fotoperíodo foram mantidos em 27°C (± 1), 33 (± 1) e 14 h de luz e 10 h de escuro, respectivamente. Os camarões foram alimentados com lula *I. argentinus*, siri *C. sapidus*, peixe *M. ancylodon* e ração Breed'S (Inve Aquaculture, Bélgica) ofertados *ad libitum* alternadamente quatro vezes ao dia. A taxa diária de renovação da água dos tanques foi de 100%. Restos de alimento, fezes e mudas foram removidas dos tanques diariamente. Após a aclimação, três experimentos foram realizados.

### ***Experimento 1***

Este experimento teve como objetivo avaliar macroscopicamente o processo de regeneração do espermatóforo após a ejaculação por meio da extrusão, determinando como ocorre morfologicamente o surgimento do novo espermatóforo na ampola terminal. Para tanto, após a aclimação, trinta machos ( $26,90 \pm 4,45$  g) no período de intermuda foram selecionados dos tanques de maturação. Os espermatóforos de cada macho foram extrusados manualmente (Nakayama *et al.* 2008). Após a extrusão, os camarões foram estocados individualmente em tanques de  $0,49 \text{ m}^2$  (150 L) com aeração suave. Parâmetros físicos e químicos da água, fotoperíodo e alimentação foram mantidos de acordo com o utilizado durante a aclimação.

Para avaliação do processo de regeneração do espermatóforo, as regiões do gonoporo e posterior à inserção do quinto par de pereópodes de todos os camarões foram examinadas visualmente uma vez ao dia (8 h). Com base nas checagens diárias, as modificações morfológicas das regiões supracitadas foram observadas macroscopicamente e diferentes estágios de regeneração foram identificados. O experimento foi conduzido até todos os camarões apresentarem os espermatóforos completamente formados.

### ***Experimento 2***

O experimento 2 teve como objetivo comparar a qualidade espermática dos diferentes estágios de regeneração do espermatóforo de *F. brasiliensis* identificados no experimento 1. Para tanto, O experimento foi conduzido sob as mesmas condições das descritas para o experimento 1, porém utilizando uma nova amostra de 30 machos ( $27,56 \pm 3,61$  g) coletados dos tanques de maturação. Foram realizadas checagens macroscópicas diárias das regiões do gonoporo e posterior à inserção do quinto par de

pereópodes de todos os camarões após a extrusão. Para a análise da qualidade espermiática, ao longo do experimento, nove machos ( $n = 9$ ) com espermatóforos no estágio em que a regeneração não estava completa foram selecionados aleatoriamente dentre os trinta inicialmente extrusados e estocados. Estes machos foram crioanestesiados e seus espermatóforos foram coletados por dissecação. Em contrapartida, machos com espermatóforos completamente regenerados ( $n = 17$ ) foram extrusados manualmente. Assim como o experimento 1, este experimento foi conduzido até o último macho vivente regenerar completamente seus espermatóforos.

### ***Experimento 3***

O objetivo do último experimento foi determinar o tempo em que os espermatóforos são completamente regenerados sem e com a ocorrência de muda após a ejaculação por meio da extrusão manual e, desta forma, avaliar o efeito da muda no processo de regeneração. Este experimento foi conduzido sob as mesmas condições dos experimentos anteriores, porém utilizando outros 30 machos ( $27,90 \pm 4,25$  g) coletados dos tanques de maturação. Checagens diárias macroscópicas das regiões do gonoporo e posterior à inserção do quinto par de pereópodes de todos os camarões após a extrusão foram realizadas, sendo registrado o tempo para que os espermatóforos atingissem o estágio de regeneração completa após a extrusão.

Quando ecdise foi encontrada durante a checagem diária em uma determinada unidade experimental, o estágio de regeneração dos espermatóforos do macho (que, portanto, se encontrava no período de pós-muda) estocado nessa unidade foi verificado com base nos resultados do experimento 1. Todos os camarões encontrados no período de pós-muda foram crioanestesiados e dissecados para coleta dos espermatóforos durante a checagem diária em que a ecdise foi encontrada. Machos em que não foi

observada ecdise foram extrusados manualmente ao final do experimento. A qualidade espermática dos espermatóforos regenerados sem e com a ocorrência de muda foi comparada. Mais uma vez, o experimento foi conduzido até todos os machos vivos regenerarem completamente seus espermatóforos.

### ***Qualidade espermática***

Nos experimentos 2 e 3, os dois espermatóforos de cada macho foram extrusados, porém apenas um dos espermatóforos foi selecionado aleatoriamente e pesado. Em seguida, cada espermatóforo foi macerado e homogeneizado em 2 mL de solução salina e 0,1 de azul de tripan. Números de espermatozoide foram estimados pela contagem das células presentes na solução resultante da homogeneização da massa espermática na solução salina com o auxílio de um hemacitômetro sob microscópio óptico (Leung-Trujillo & Lawrence 1987). Células com má-formação do corpo principal e/ou deformação do espinho (quebra, curvatura ou ausência) foram identificadas e classificadas como anormais. Células coradas de azul pelo azul de tripan foram classificadas como mortas.

### ***Análises estatísticas***

Dados expressos em porcentagens foram transformados em arco seno da raiz quadrada anteriormente às análises, porém apenas os valores originais são apresentados. As premissas normalidade (teste Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade (teste de Levene) foram verificadas. A qualidade espermática nos experimentos 2 e 3 foi analisada por teste t de Student ( $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS

### *Experimento 1*

Modificações quanto à opacidade da região posterior à inserção do quinto par de pereópodes e à turgidez da região do gonoporo foram identificadas durante o processo de regeneração dos espermatóforos. Com base nessas modificações, três estágios de regeneração dos espermatóforos foram identificados após a extrusão: não formado, no qual a região posterior à inserção do quinto par de pereópodes é transparente e a região do gonoporo é pouco túrgida (Fig. 4.3A); formado, sendo a região posterior à inserção do quinto par de pereópodes opaca e a região do gonoporo túrgida, forçando a aproximação dos lados (Fig. 4.3C); e parcialmente formado, apresentando características intermediárias quando comparado com os demais estágios (Fig. 4.3B). Os espermatóforos parcialmente formados são maleáveis e apresentam formato esférico, enquanto formados são maiores mais rígidos e alongados (Fig. 4.4).



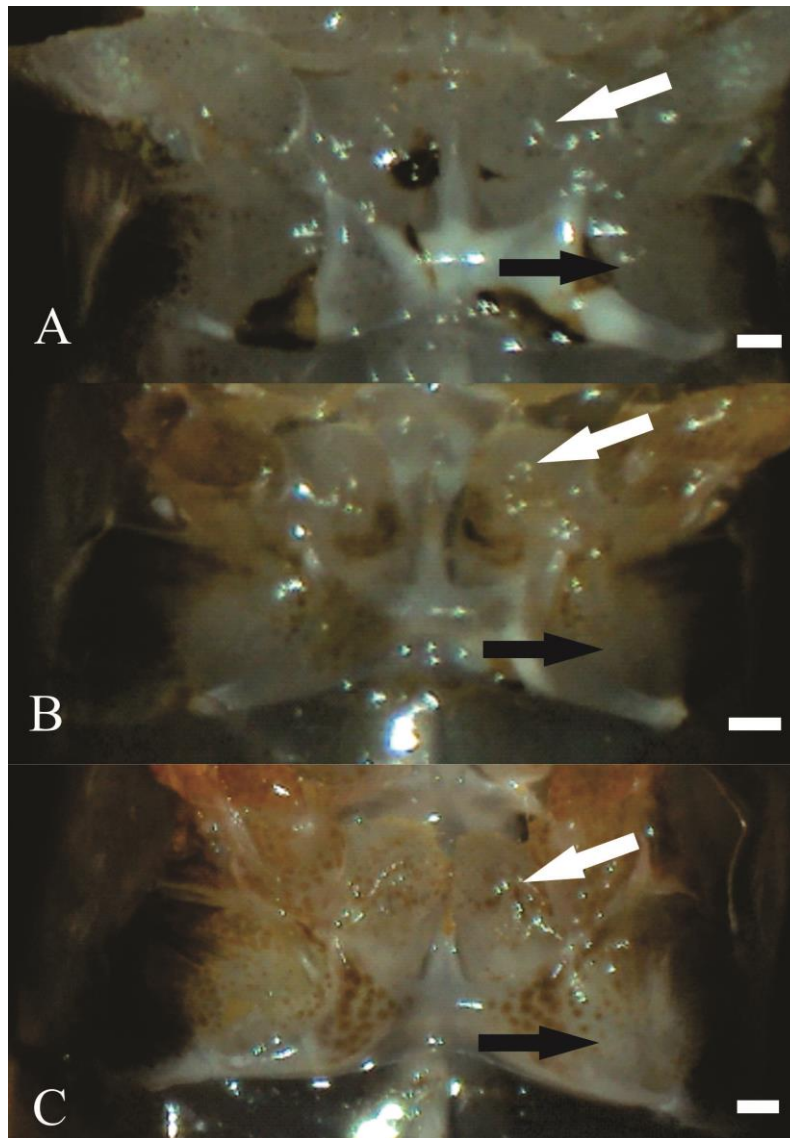


Figura 4.3: Regiões do gonoporo (setas brancas) e posterior à inserção do quinto par de pereópodes (setas pretas) de machos de *Farfantepenaeus brasiliensis* em diferentes estágios de regeneração do espermatóforo. (A) Macho com espermatóforo não formado. (B) Macho com espermatóforo parcialmente formado. (C) Macho com espermatóforo formado. Barras = 1 mm.

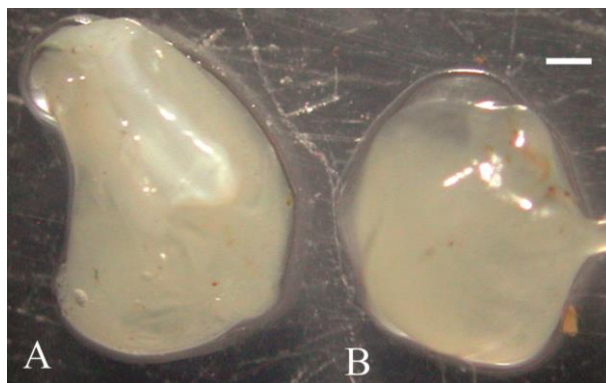


Figura 4.4: Espermatóforos de *Farfantepenaeus brasiliensis* em diferentes estágios de regeneração. (A) Espermatóforo formado. (B) Espermatóforo parcialmente formado. Barra = 1 mm.

### Experimento 2

O número de espermatozoides foi significativamente menor nos espermatóforos parcialmente formados. No entanto, o peso do espermatóforo não diferiu significativamente entre os estágios. Os demais parâmetros da qualidade espermática também não apresentaram diferenças significativas entre os estágios de regeneração do espermatóforo de *F. brasiliensis* (Tab. 4.1).

Tabela 4.1: Qualidade espermática de espermatóforos de *Farfantepenaeus brasiliensis* formados e parcialmente formados.

	Parcialmente formado (n = 9)	Formado (n = 17)
Peso do espermatóforo (mg)	$24 \pm 3^a$	$28 \pm 5^a$
Nº de espermatozoides ( $\times 10^6$ )	$1,20 \pm 0,70^a$	$6,02 \pm 3,66^b$
Espermatozoides normais (%)	$60,56 \pm 21,64^a$	$58,43 \pm 21,61^a$
Espermatozoides anormais (%)	$39,43 \pm 21,64^a$	$41,57 \pm 21,61^a$
Espermatozoides mortos (%)	$2,29 \pm 3,27^a$	$2,22 \pm 5,31^a$

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

### Experimento 3

Na figura 4.5 estão demonstrados os percentuais de cada estágio de regeneração identificado no experimento 1 para a população de machos estudada no presente estudo ao longo de 16 dias. É possível observar que no dia 0, quando todos os machos foram extrusados, 100% da população estava com espermátóforos não formados (cinza claro). A partir do dia 1, os percentuais de espermátóforos parcialmente formados e formados (cinza escuro e preto em cada coluna da figura, respectivamente) aumentaram progressivamente até atingir 100% da população com espermátóforos formados no dia 16. As setas nos dias 1, 2, 5, 6, 10 e 13 indicam dias em que ecdises foram encontradas nas unidades experimentais. Na figura, é possível observar que, até o 11º dia, o percentual de formados aumentou somente nos dias em que as mudas foram encontradas (setas). Somente a partir do 12º dia, o percentual de espermátóforos formados aumentou sem a ocorrência de muda.

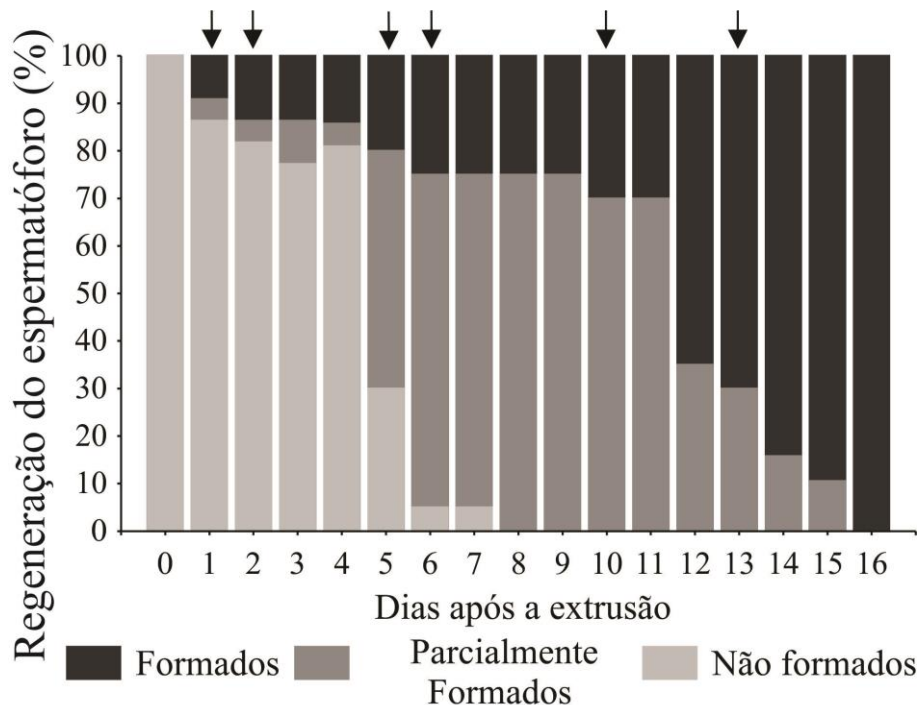


Figura 4.5: Percentuais de cada estágio de regeneração do espermátóforo da população de machos de *Farfantepenaeus brasiliensis* selvagem estudada no presente estudo após a extrusão manual. Setas indicam dias em que mudas foram encontradas nos tanques.

Na Tabela 4.2, a qualidade espermática dos espermátóforos formados gradualmente e daqueles formados após o processo de muda está demonstrada. Os parâmetros não apresentaram diferenças significativas entre os grupos de espermátóforos.

Tabela 4.2: Qualidade espermática de espermátóforos de *Farfantepenaeus brasiliensis* formados naturalmente e após a muda.

	Formados gradualmente (n = 9)	Formados após a muda (n = 16)
Peso do espermátóforo (mg)	29 ± 5	23 ± 5
Nº de espermatozoides (x 10 <sup>6</sup> )	7,79 ± 6,72	5,32 ± 3,33
Espermatozoides normais (%)	66,31 ± 18,52	54,75 ± 25,75
Espermatozoides anormais (%)	33,69 ± 18,52	45,24 ± 25,75
Espermatozoides mortos (%)	0,68 ± 1,89	2,03 ± 5,39

## DISCUSSÃO

Observações da morfologia do espermátóforo de *Farfantepenaeus* têm sido realizadas para *F. paulensis*, *Farfantepenaeus aztecus* (Ives, 1891) e *Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad, 1939) (Bauer & Cash 1991, Braga *et al.* 2013b). Os espermátóforos de *F. brasiliensis* classificados neste estudo como formados têm a forma congruente com o padrão previamente descrito para o gênero, o qual compreende uma estrutura rígida e alongada. Em contrapartida, os espermátóforos parcialmente formados identificados no presente estudo não apresentaram a forma típica frequentemente observada em espécies de télico fechado, sendo esférico.

Além da diferença morfológica, espermátóforos parcialmente formados e formados se diferenciaram no presente estudo pelo número de espermatozoides contidos neles. Espermátóforos formados apresentaram número de espermatozoides significativamente maior do que os parcialmente formados. No entanto, estes estágios

de regeneração apresentaram peso do espermátóforo semelhante entre si. Estes resultados têm importante consequência para o entendimento do processo de regeneração do espermátóforo de *F. brasiliensis*.

Segundo Díaz *et al.* (2001), o peso do espermátóforo é mais dependente de seus componentes estruturais do que da quantidade de células espermáticas contidas nele. Os espermátóforos são estruturalmente formados por secreções de glândulas presentes ao longo do vaso deferente do camarão (Malek & Bawab 1974a). Em *L. setiferus*, uma camada quitinosa nos espermátóforos foi identificada (Malek & Bawab 1974a). No entanto, de maneira geral, a natureza dos componentes estruturais que formam os espermátóforos dos decápodos permanece desconhecida (Malek & Bawab 1974a, Subramoniam 1991).

Desta forma, com base nos resultados obtidos nesse estudo, é possível inferir que o processo de regeneração do espermátóforo de *F. brasiliensis* provavelmente compreende as seguintes fases no trato reprodutivo dos machos: (1) deposição na ampola terminal de um espermátóforo primitivo, o qual provavelmente já apresenta os componentes estruturais semelhantes ao do espermátóforo formado; (2) deposição gradual dos espermatozoides; (3) enrijecimento do espermátóforo, assumindo a usual forma alongada e dividida em corpo principal e apêndice.

Para *P. kerathurus*, três fases sucessivas também são observadas durante a formação do espermátóforo da espécie. Na primeira, os espermatozoides são convertidos em uma massa compacta. Essa fase começa no vaso deferente proximal, passando pelo vaso deferente médio, onde camadas acelulares começam a ser depositadas em volta da massa espermática, e é finalizado somente quando os espermatozoides atingem a ampola terminal, onde a massa espermática resultante é retida até a próxima fase. Na segunda fase, mais camadas acelulares que constituem os

espermatóforos são depositadas pelas glândulas secretoras. Por fim, na fase três, o espermatóforo é moldado na forma final e enrijecido (Malek & Bawab 1974a).

As fases sugeridas para a regeneração em *F. brasiliensis* (neste estudo) e *P. kerathurus* (Malek & Bawab 1974a) apresentam uma diferença relacionada à deposição dos espermatozoides, pois, com base nos resultados do presente estudo, os espermatozoides continuariam sendo depositados após a massa espermática inicial atingir a ampola terminal. É importante ressaltar que o estudo de Malek & Bawab (1974a) foi baseado em observações histológicas e esclarece a origem das camadas acelulares que recobrem os espermatóforos, porém o número de espermatozoides contidos na massa espermática ao final da fase 1 não foi estimado. Desta forma, mais estudos sobre a formação do espermatóforo de diferentes gêneros de peneídeos são recomendáveis para confirmar essa diferença.

Quanto ao tempo de regeneração do espermatóforo, Pascual *et al.* (1998) encontraram completa regeneração em *L. setiferus* em 8 dias a 25°C, 7 dias a 30°C e 6 dias a 33°C após a extrusão elétrica. Rosas *et al.* (1993), mantendo *L. setiferus* a 27°C, encontraram que os espermatóforos foram completamente regenerados após 7 dias da extrusão elétrica. Leung-Trujillo & Lawrence (1991) encontraram um período de 5 a 7 dias para a completa regeneração do espermatóforo de *L. setiferus*.

Com base nos resultados obtidos neste estudo foi possível observar que o espermatóforo de *F. brasiliensis* mantido a 27°C ( $\pm 1$ ) demandou maior tempo para a regeneração após a extrusão manual do que *L. setiferus* nos estudos citados acima. Os primeiros espermatóforos de *F. brasiliensis* gradualmente formados foram observados a partir do 12º dias após a extrusão. A formação dos espermatóforos dos machos estudados seguiu até o 16º dia, quando todos os machos tinham seus espermatóforos

completamente regenerados. A hipótese de que essa é uma discrepância relacionada a diferenças interespecíficas e da estrutura do espermatóforo deve ser considerada.

Assim como em outros estudos, tais como os de Heitzmann *et al.* (1993) e Parnes *et al.* (2006), foi observado neste estudo que a muda afeta diretamente a regeneração do espermatóforo de *F. brasiliensis*. Todos os machos encontrados no período de pós-muda durante a checagem diária deste estudo já possuíam espermatóforos formados, o que indica que em *F. brasiliensis* a estrutura é regenerada em até 24 h após a muda.

A análise da qualidade espermática demonstrou que não há diferenças entre os espermatóforos de *F. brasiliensis* formados gradualmente e após a muda. Estes resultados estão de acordo com as observações feitas por Heitzmann *et al.* (1993) para *L. vannamei*. Segundo os autores, na manhã seguinte a muda, o número de espermatozoides contidos no novo espermatóforo permanece constante ao longo da intermuda. Adicionalmente, os mesmos autores relataram que não há evidências da relação entre muda e espermatogênese. Desta forma, a muda provavelmente atua especificamente sobre a regeneração, acelerando as três fases da regeneração anteriormente descritas.

Resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo foram observados para *L. vannamei*. Parnes *et al.* (2006) relatam que o espermatóforo dessa espécie começa a ser degradado 12 h antes da muda e, após 36 h, um novo par de espermatóforos pode ser observado através da cutícula. Heitzmann *et al.* (1993) encontraram espermatóforo completamente regenerados na mesma espécie após 24 h da muda. O curto tempo para a regeneração do espermatóforo após a muda pode ser justificado por meio de observações histológicas de Malek & Bawab (1974a, b). Os autores demonstraram que *P. kerathurus* possui dois espermatóforos ao longo do seu

vaso deferente, um completamente formado acomodado na ampola terminal, enquanto outro é simultaneamente formado no vaso deferente médio.

Alguns autores sugerem que a muda atua como um fator controlador da renovação de espermatozoides velhos na ausência de cópula. Desta forma, a renovação do espermatozoides estaria atrelada ao ciclo hormonal dos camarões (Heitzmann *et al.* 1993, Alfaro-Montoya 2010). Com base nos resultados apresentados neste estudo é possível adicionar a essas observações que a muda não apenas atua renovando espermatozoides não ejaculados, mas também acelerando a regeneração após a extrusão.

## CONCLUSÕES

A regeneração do espermatozoides de *F. brasiliensis* compreende três estágios referentes à formação do mesmo após a extrusão: não formado, parcialmente formado e formado. As seguintes fases compreendem a regeneração dos espermatozoides no trato reprodutivo: (1) deposição de um espermatozoides primitivo na ampola terminal, no qual todos os componentes estruturais já estão incluídos, sendo, portanto, o seu peso é constante até o final da regeneração; (2) deposição gradual dos espermatozoides; (3) enrijecimento do espermatozoides, assumindo a usual forma alongada.

Quando não ocorre muda durante o período de regeneração, espermatozoides nos três estágios de regeneração são observados e a completa formação ocorre em até 16 dias. Em contrapartida, quando ocorre muda, um novo espermatozoides é formado em até de 24 h. Os espermatozoides formados após a muda possuem qualidade espermática semelhante àqueles formados gradualmente. Desta forma, é possível inferir que a influência da muda na regeneração do espermatozoides não está exclusivamente associada à degradação dessa estrutura na falta de ejaculação, mas este processo também acelera a regeneração mesmo que o espermatozoides tenha sido extrusado.



## **CAPÍTULO 5**

### **MELANIZAÇÃO HEMOCÍTICA DO ESPERMATÓFORO DE *Farfantepenaeus brasilensis* DECORRENTE DE SUCESSIVAS EXTRUSÕES MANUAIS**

## INTRODUÇÃO

Em crustáceos, a melanização é um processo caracterizado pela deposição extracelular da melanina nos tecidos do animal. A melanina é produzida pelo sistema profenoloxidase (proPO) (Alfaro *et al.* 1993). A proPO é uma pró-enzima inativa presente na hemolinfa e é ativada para fenoloxidase (PO) quando esta reage com lipopolissacarídeos bacterianos, uréia, íons cálcio, calor, entre outros. A PO é a responsável pela síntese e deposição da melanina (Sarathi *et al.* 2007).

A melanização do espermatóforo de camarões pode ocasionar a redução da qualidade espermática geralmente por meio da redução progressiva do número de espermatozoides e pelo aumento de células anormais e mortas. O processo de melanização pode evoluir para deterioração do espermatóforo e, em alguns casos, alcança o trato reprodutivo, quando, então, a capacidade reprodutiva do animal é comprometida (Díaz *et al.* 2001).

Para camarões, Alfaro *et al.* (1993) sugeriram que a melanização dos espermatóforos e do trato reprodutivo pode ser resultado de duas síndromes distintas. Segundo estes autores, a Melanização do Sistema Reprodutivo do Macho (MRSM, sigla em inglês) é a síndrome associada a infecções causadas por patógenos como as bactérias oportunistas, *Vibrio alginolyticus* (Miyamoto *et al.*, 1961), *Pseudomonas putrefaciens* (Derby & Hammer, 1931) e outras. Enquanto, a Síndrome Degenerativa do Trato Reprodutivo de Machos (MRTDS, sigla em inglês) está associada a problemas endócrinos ocasionados pelo estresse induzido por fatores como temperaturas elevadas (Pascual *et al.* 1998, 2003, Perez-Velazquez *et al.* 2001, Sánchez *et al.* 2001), dieta inapropriada (Goimier *et al.* 2006, Braga *et al.* 2010), entre outros.

Em caso de MRSM, a melanina é depositada pela PO em locais próximos a invasão de patógenos (Vargas-Albores & Yepiz-Plascencia 2000). Em contrapartida,

para MRTDS, Sánchez *et al.* (2001) propuseram a seguinte sequência para explicar a evolução da síndrome: (1) em condições de cultivo, fatores como temperatura ou alimentação podem ocasionar estresse; (2) esse estresse reduz a capacidade imunológica pela redução de hemócitos, alterando os mecanismos de regulação do proPO; (3) essa alteração produz um aumento na atividade do sistema de proPo, que aumenta a produção de melanina; (4) o aumento de melanina degenera as células e, por fim, pode levar a esterilização dos machos.

Alguns estudos têm demonstrado uma terceira causa de melanização do espermátóforo de camarões, um processo natural de degeneração do espermátóforo (Alfaro & Lozano 1993, Heitzmann *et al.* 1993, Diamond *et al.* 2008). Esse processo corresponde à renovação de espermátóforos antigos na ausência de ejaculação e é caracterizado pela deposição de melanina no espermátóforo, ocasionando sua degeneração. Após a completa degeneração dos espermátóforos velhos, novos espermátóforos sem melanização são depositados e formados na ampola terminal (Parnes *et al.* 2006). A degeneração do espermátóforo só tem sido descrita para *L. vannamei* domesticados. Não há indícios de que esse processo atue na renovação de espermátóforos de camarões selvagens, nos quais cópula e muda seriam os fatores controladores da renovação. Assim, essa degeneração seria um processo estritamente relacionado a condições de cativeiro (Alfaro-Montoya 2010).

A melanização é um processo frequentemente observado em estudos sobre a qualidade espermática de indivíduos selvagens de *Farfantepenaeus* realizados em cativeiro. A causa dessa melanização tem sido atribuída geralmente ao estresse, porém ainda não foi adequadamente investigada. Desta forma, no presente estudo, a melanização do espermátóforo de *F. brasiliensis* selvagens foi avaliada após sucessivas extrusões manuais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Origem dos animais e aclimação*

Os procedimentos de captura e aclimação as condições de laboratório de reprodutores de *F. brasiliensis* foram os mesmos daqueles descritos no Capítulo 4.

### *Desenho experimental*

Após o período de aclimação, 50 machos ( $28,54 \pm 4,94$  g) no período da intermuda e sem melanização aparente foram selecionados e distribuídos em 25 tanques de  $0,49 \text{ m}^2$  com aeração suave e constante. Os camarões foram alimentados com lula *I. argentinus*, siri *C. sapidus*, peixe *M. ancylodon* e ração Breed's (Inve Aquaculture, Bélgica) ofertados *ad libitum* alternadamente quatro vezes ao dia (9, 12, 15, 18 h). A água foi mantida a  $27^\circ\text{C}$  ( $\pm 1$ ) e 33 de salinidade ( $\pm 1$ ), sendo renovada diariamente a 100%. O fotoperíodo foi de 14 h de luz e 10 h de escuro. Os camarões mortos foram diariamente removidos de seus tanques e contabilizados.

O experimento teve duração de 30 dias. Nos dias 0, 15 e 30, os espermatóforos foram extrusados manualmente (Nakayama *et al.* 2008), correspondendo as extrusões 1, 2 e 3, respectivamente. A periodicidade das extrusões foram baseadas nos resultados do experimento 3 do Capítulo 4. Na extrusão 1, os espermatóforos de todos os machos foram extrusados. Nas extrusões seguintes, a ocorrência de melanização foi observada por exame visual e os espermatóforos de todos os camarões vivos e no período de intermuda foram novamente extrusados. Na extrusão 2, camarões encontrados no período de pós-muda foram retirados do experimento tendo em vista a impossibilidade de extrusão sem causar a morte do animal. Nas extrusões 2 e 3, apenas os espermatóforos melanizados foram usados para avaliação da qualidade espermática e análise histológica.

### ***Qualidade espermática e análise histológica***

Na tabela 5.1 está resumido o número de espermatozoides utilizados em cada análise por extrusão. Os espermatozoides selecionados para qualidade espermática foram sempre de machos diferentes, o mesmo foi feito para a análise histológica.

Tabela 5.1: Número de espermatozoides melanizados de *Farfantepenaeus brasiliensis* usados nas análises de qualidade espermática e histológica nas extrusões 1, 2 e 3.

	Extrusão 1	Extrusão 2	Extrusão 3
Machos vivos	50	42	34
Machos em pós-muda	0	2	1
Machos com 1 espermatozoides melanizados	0	3	3
Machos com 2 espermatozoides melanizados	0	2	6
Total de espermatozoides melanizados	0	7	15
Usados para qualidade espermática	15	4	9
Usados para histologia	5	3	6

A metodologia descrita previamente no Capítulo 4 foi utilizada para a avaliação da qualidade espermática nas três extrusões. Para a análise histológica, os espermatozoides foram fixados em formol 10% e foram processados em equipamento automático (LUPE PT05, Brasil), sendo a inclusão feita em paraplast. Os blocos foram cortados a 3 µm em micrótomo (LUPE MRP03, Brasil) e corados com hematoxilina e eosina e Fontana-Masson para melanina. Em alguns cortes, a melanina foi removida com permanganato de potássio a 0,25% e ácido oxálico a 5% para avaliar a presença de patógenos. As lâminas foram examinadas em microscópio óptico (Olympus BX 45, EUA) com câmera digital (Olympus DP 72, EUA) acoplada para captura das imagens.

### *Análises estatísticas*

A transformação de dados em porcentagem e nível de segurança foram os mesmos utilizados no Capítulo 4. No entanto, diferenças significativas dos parâmetros da qualidade espermática entre as extrusões (1, 2 e 3) foram verificadas por meio do teste não paramétrico Kruskal-Wallis (Sokal & Rohlf 1995).

## RESULTADOS

A sobrevivência média dos camarões reduziu após cada extrusão, enquanto o percentual de melanização aumentou. Os espermatozoides melanizados coletados na extrusão 3 apresentaram peso significativamente menor do que os espermatozoides não melanizados (extrusão 1). O número de espermatozoides e o percentual de células normais reduziram significativamente nos espermatozoides melanizados (extrusões 2 e 3) em comparação com espermatozoides não melanizados (Tab. 5.2).

Tabela 5.2: Sobrevivência e qualidade espermática de *Farfantepenaeus brasiliensis* após sucessivas extrusões.

	Extrusão 1	Extrusão 2		Extrusão 3	
		Não Melanizados	Melanizados	Não Melanizados	Melanizados
Sobrevivência (%)	-	84	-	68	-
Melanização (%)	0	11,9	-	26,47	-
Peso do espermatozóide (mg)	34,38 ± 4,16 <sup>a</sup>	28,06 ± 6,84 <sup>a,b</sup>	28,19 ± 6,58 <sup>a,b</sup>	24,30 ± 4,59 <sup>b</sup>	23,37 ± 4,93 <sup>b</sup>
Nº de espermatozoides (x 10 <sup>6</sup> )	10,48 ± 2,51 <sup>a</sup>	10,76 ± 3,56 <sup>a</sup>	4,69 ± 1,19 <sup>b</sup>	8,13 ± 0,64 <sup>a</sup>	5,13 ± 1,57 <sup>b</sup>
Espermatozoides normais (%)	74,03 ± 14,68 <sup>a</sup>	79,56 ± 20,85 <sup>a</sup>	33,16 ± 12,89 <sup>b</sup>	79,22 ± 7,81 <sup>a</sup>	33,34 ± 18,03 <sup>b</sup>
Espermatozoides anormais (%)	25,97 ± 14,68 <sup>a</sup>	20,44 ± 20,85 <sup>a</sup>	66,84 ± 12,89 <sup>b</sup>	20,78 ± 7,81 <sup>a</sup>	66,66 ± 18,03 <sup>b</sup>

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (P<0,05).

Nas Figuras 5.1 e 5.2 são demonstrados cortes histológicos de espermatóforos melanizados coletados nas extrusões 2 e 3. Na Figura 5.1, a massa espermática de um espermatóforo melanizado é demonstrado. Os espermatozoides foram basófilos e, em sua maioria, apresentaram deformação do corpo principal e/ou ausência do espinho.

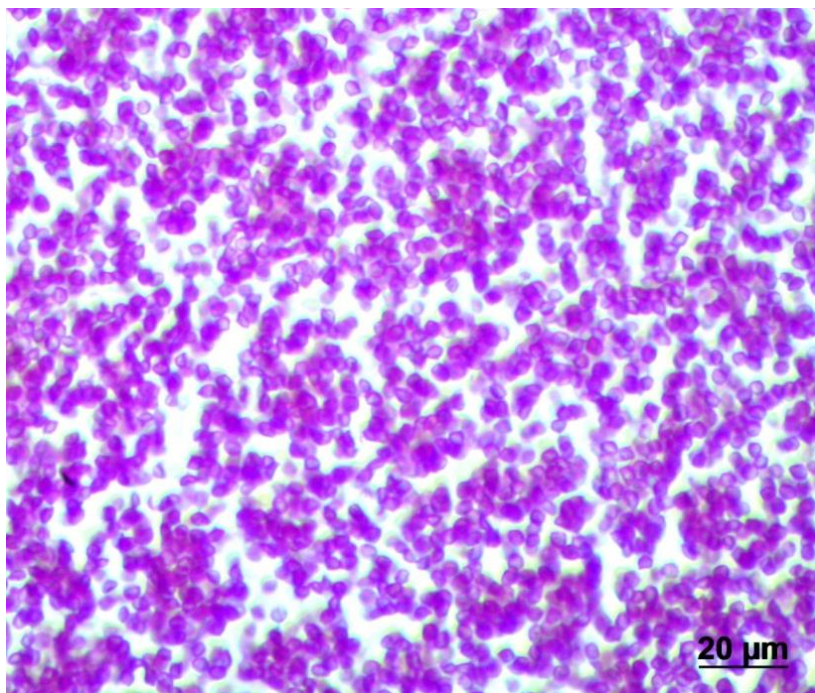


Figura 5.1: Massa espermática contida no espermatóforo melanizado de *Farfantepenaeus brasiliensis*, mostrando espermatozoides, em sua maioria, com deformidade do corpo principal e/ou ausência do espinho. Coloração H-E.

Na Figura 5.2A é possível observar que espermatóforos melanizados apresentaram densa infiltração hemocítica sem a presença de patógenos em torno do tecido conectivo. Em contrapartida, na Figura 5.2B é demonstrado que, em alguns casos, os hemócitos também ocorreram no tecido conectivo. Estas células foram basófilas, com seus núcleos fortemente basófilos. Hemócitos não foram observados na massa espermática em nenhum espermatóforo analisado. Não foi observada infiltração hemocítica nos cortes histológicos de espermatóforos não melanizados das extrusões 1, 2 e 3 (Fig. 5.3).

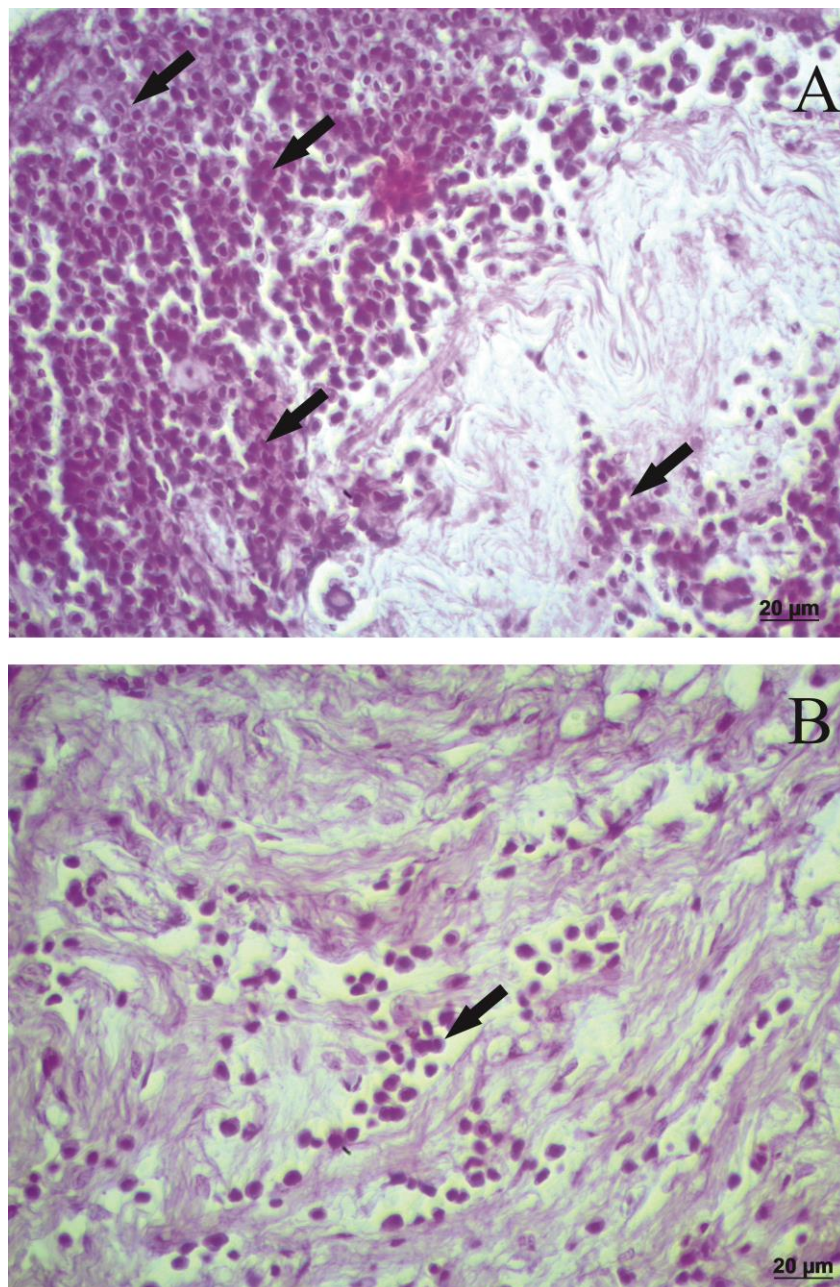


Figura 5.2: Fotomicrografias de espermatóforos melanizados de *Farfantepenaeus brasiliensis*. (A) Infiltração hemocítica em torno do tecido conectivo. (B) Infiltração hemocítica no tecido conectivo. Coloração H-E.



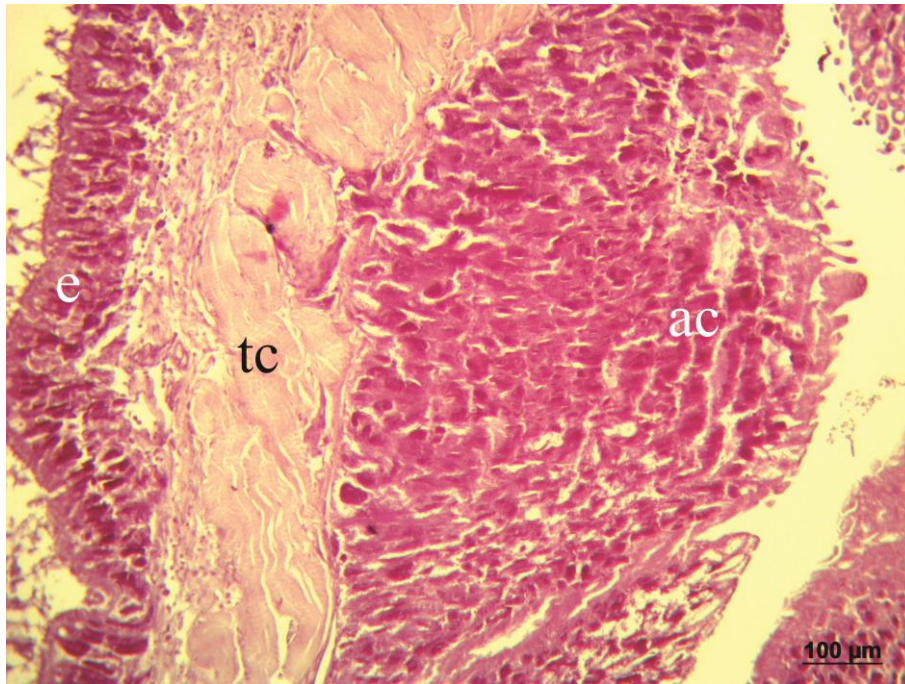


Figura 5.3: Fotomicrografia de um espermátóforo não melanizado de *Farfantepenaeus brasiliensis* coletado na extrusão 2, mostrando a ausência de hemócitos infiltrados no epitélio (e), tecido conectivo (tc) e no aglomerado celular (ac) que compõem a estrutura do espermátóforo. Coloração H-E.

## DISCUSSÃO

De acordo com resultados da análise histológica realizada no presente estudo, os espermátóforos melanizados de *F. brasiliensis* apresentaram densa infiltração hemocítica sem a presença de patógenos. Para invertebrados, é sabido que a produção de melanina pelo sistema proPO pode ser desencadeada em resposta a um dano no tecido (Cerenius & Söderhäll 2004). Assim, no presente estudo, foi possível relacionar a infiltração hemocítica com o método de compressão manual para extrusão do espermátóforo. Essa relação pode ser corroborada pelo aumento progressivo do percentual de espermátóforos melanizados a cada extrusão. Desta forma, provavelmente o método de extrusão manual desencadeia um processo inflamatório, o que resulta na produção de melanina pelo sistema proPO.

A relação entre extrusão e melanização foi previamente considerada na literatura. Por exemplo, Chamberlain *et al.* (1983) sugeriram, como uma possibilidade, que a melanização dos tratos reprodutivos de machos de *L. stylirostris*, *L. setiferus* e *L. vannamei* tenha sido consequência do trauma causado pela extrusão manual ou elétrica. De forma semelhante, Harris & Sandifer (1986) relataram a relação entre melanização e a frequência de extrusão elétrica em *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). No entanto, a causa dessa relação não foi demonstrada histologicamente em nenhum dos dois estudos supracitados.

A melanização do espermátforo decorrente de um processo inflamatório se diferencia das demais causas pela ocorrência de hemócitos ao redor ou em meio ao tecido conectivo da estrutura do espermátforo. Em casos de MRSM, a presença de microorganismos patógenos, principalmente bactérias, caracteriza a síndrome (Chamberlain *et al.* 1983, Leung-Trujillo & Lawrence 1987, Talbot *et al.* 1989, Alfaro *et al.* 1993). Enquanto em MRTDS e na degeneração natural do espermátforo, bactérias, fungos ou hemócitos estão ausentes (Dougherty & Dougherty 1989, Sánchez *et al.* 2001, Diamond *et al.* 2008). Essas duas últimas vias de melanização do espermátforo podem ser diferenciadas pela redução de hemócitos na hemolinfa decorrente de um estresse característica de MRTDS (Sánchez *et al.* 2001).

No presente estudo, hemócitos não foram observados infiltrados na massa espermática (Fig. 5.1). No entanto, os números de espermatozoides totais e normais foram significativamente menores em espermátforos melanizados (extrusão 2 e 3).

Diamond *et al.* (2008) encontraram uma redução de espermatozoides normais em espermátforos de *L. vannamei* melanizados provavelmente resultante da degeneração natural. Segundo os autores, a maioria das células observadas em espermátforos melanizados era pequena, com deformações do corpo principal e sem

espinhos, como observado neste estudo (Fig. 5.1). Dougherty & Dougherty (1989) observaram um grande número de espermatozoides sem espinhos com aparência de células danificadas e em degeneração em espermatóforos melanizados de *L. vannamei*. Estes autores sugerem que a presença de melanina no espermatóforo causaria a despolimerização do espinho, explicando a redução do número de espermatozoides normais.

A redução do número de espermatozoides totais observada para *F. brasiliensis* é um resultado intrigante diante do atual conhecimento sobre a degeneração das células espermáticas. Assim como no presente estudo, Diamond *et al.* (2008) não observaram hemócitos infiltrados na massa espermática, porém demonstraram *in vitro* que estas células reconhecem e fagocitam espermatozoides anormais contidos em espermatóforos melanizados. Entretanto, não há indícios de que esta interação ocorra *in vivo*, o que dificulta a explicação como os espermatozoides são degenerados sem a participação de hemócitos. Desta forma, a hipótese de Dougherty & Dougherty (1989) de que, após a despolimerização do espinho, o espermatozoide é degenerado quando a melanina está depositada no espermatóforo deve ser considerada.

Adicionalmente, é importante ressaltar que, diferentemente dos estudos de Dougherty & Dougherty (1989) e Diamond *et al.* (2008), sucessivas extrusões foram realizadas no presente estudo, desencadeando um processo inflamatório. No Capítulo 4, foi sugerido que, durante a regeneração do espermatóforo de *F. brasiliensis*, um espermatóforo primitivo é depositado na ampola terminal e os espermatozoides continuam sendo depositados até a completa regeneração do espermatóforo, aumentando gradativamente o número de células. Desta forma, também deve ser considerada a hipótese de que o processo inflamatório na ampola terminal pode diminuir ou mesmo interromper a deposição de espermatozoides no espermatóforo. No

entanto, mais estudos histológicos dos espermatóforos de *F. brasiliensis* após a extrusão manual são necessários para confirmação dessa hipótese.

No presente estudo, o peso dos espermatóforos reduziu significativamente na extrusão 3 em comparação com a extrusão 1. Esta redução aparentemente não está associada ao processo inflamatório que ocasionou redução do número de espermatozoides totais e normais, uma vez que a diminuição do peso também foi observada em espermatóforos não melanizados obtidos na extrusão 3. Em complemento a esses resultados, nos cortes histológicos de espermatóforos não melanizados das três extrusões não foram observadas infiltrações hemocíticas. Desta forma, é provável que a redução do peso do espermatóforo observada no presente estudo após sucessivas extrusões esteja relacionada ao início de um processo de exaustão reprodutiva. No entanto, mais estudos sobre sucessivas extrusões em *F. brasiliensis* são necessários para que sejam obtidos resultados mais conclusivos sobre a hipótese de exaustão reprodutiva.

Resultados sobre a qualidade espermática após a regeneração do espermatóforo extrusado consecutivamente não têm sido consistentes e podem estar relacionados a diferenças entre espécies. Por exemplo, para *L. setiferus*, tem sido observada uma redução significativa da qualidade espermática após consecutivas regenerações (Leung-Trujillo & Lawrence 1991, Rosas *et al.* 1993, Pascual *et al.* 1998). Em contrapartida, para *L. vannamei*, resultados inversos têm sido demonstrados (Alfaro 1993, Alfaro & Lozano 1993, Ceballos-Vázquez *et al.* 2004).

A compressão manual da região do quinto par de pereiópodos tem sido a técnica mais utilizada para extrusão dos espermatóforos em estudos com camarões rosa (Peixoto *et al.*, 2005, Braga *et al.* 2011). Nakayama *et al.* (2008) compararam a qualidade espermática de *F. paulensis* após a regeneração de espermatóforos extrusados manual e eletricamente e não encontraram diferenças entre os métodos. No entanto, a

avaliação comparativa do percentual de melanização, bem como de observações histológicas de espermatóforos regenerados, após a extrusão por diferentes métodos não está disponível na literatura para camarões rosa. Desta forma, faz-se necessário avaliar se o uso do método elétrico pode ser uma alternativa para a redução dos percentuais de melanização após sucessivas extrusões, mantendo a qualidade espermática de *F. brasiliensis* ao longo das consecutivas regenerações do espermatóforo.

## **CONCLUSÕES**

A extrusão manual a cada 15 dias aumentou progressivamente o percentual de espermatóforos melanizados de *F. brasiliensis*. Um processo inflamatório, caracterizado pela presença de hemócitos em volta ou no tecido conectivo, foi identificado como o fator responsável pela melanização dos espermatóforos. A infiltração hemocítica não foi observada na massa espermática, porém, a quantidade e a qualidade dos espermatozoides foram afetadas negativamente pela presença da melanina no espermatóforo.

## CONCLUSÕES GERAIS

Os capítulos apresentados nesta tese demonstram a aplicabilidade do estudo das ultraestruturas dos espermatozoides de Decapoda em investigações sobre relações filogenéticas e evolução da morfologia. No entanto, é importante salientar que não apenas os espermatozoides são estruturas reprodutivas com potencial para aplicação nestes tipos de investigações. Os espermatóforos e os petasmas, por exemplo, são estruturas secundárias masculinas com caracteres bem conservativos entre os grupos taxonômicos que podem prover importante embasamento para estudos filogenéticos.

Na presente tese também foi demonstrado que o estudo morfológico de estruturas reprodutivas tem aplicação direta em aquicultura. O estudo da capacitação, por exemplo, além de ser um interessante campo para investigações morfológicas, tem aplicação na produção de camarões em cativeiro. A necessidade de estocagem do espermatóforo no télico para que os espermatozoides adquiram a capacidade de fertilização tem inviabilizado a reprodução *in vitro* em laboratórios de produção de pós-larvas de camarão. As informações limitadas são um entrave para o desenvolvimento de biotecnologias que induzam este processo sem a necessidade de estocagem do espermatóforo no télico.

De forma semelhante, o estudo do espermatóforo é fundamental para o manejo de estoques de reprodutores em cativeiro. Os resultados apresentados nos Capítulos 4 e 5 são importantes por contribuir com o conhecimento dos processos de regeneração e melanização. No entanto, esses resultados também podem ser aplicados em aquicultura, visando à elaboração de estratégias que permitam a manutenção da qualidade dos espermatóforos por maior tempo, reduzindo a dependência de animais selvagens.

**LITERATURA CITADA**

- AHYONG, ST & D O'MEALLY. 2004. Phylogeny of the decapoda reptantia: resolution using three molecular loci and morphology. *Raffles B. Zool.*, 52(2): 673-693.
- ALFARO, JM. 1993. Reproductive quality evaluation of male *Penaeus stylirostris* from a grow-out pond. *J. World Aquacult. Soc.*, 24(1): 6-11.
- ALFARO, JM & X LOZANO. 1993. Development and deterioration of spermatophores in pond-reared *Penaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.*, 24(4): 522-529.
- ALFARO, JM, AL LAWRENCE & D LEWIS. 1993. Interaction of bacteria and Male Reproductive System Blackening Disease of captive *Penaeus setiferus*. *Aquaculture*, 117: 1-8.
- ALFARO, J, N MUÑOZ, M VARGAS & J KOMEN. 2003. Induction of sperm activation in open and closed thelycum penaeoid shrimps. *Aquaculture*, 216: 371-381.
- ALFARO, J, K ULATE & M VARGAS. 2007. Sperm maturation and capacitation in the open thelycum shrimp *Litopenaeus* (Crustacea: Decapoda: Penaeoidea). *Aquaculture*, 270: 436-442.
- ALFARO-MONTOYA, J. 2010. The reproductive conditions of males shrimps, genus *Penaeus*, sub-genus *Litopenaeus* (open thelycal penaeoid shrimps): A review. *Aquaculture*, 300: 1-9.
- ALMEIDA, HLPS & F D'INCAO. 1999. Análise do esforço de pesca do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) na Lagoa dos Patos, Brasil. *Atlântica*, 21: 77-92.
- ARSENAULT, AL, RE CLATTENBURG & PH ODENSE. 1979. Spermiogenesis in the shrimp, *Cragon septemspinosa*, Say. *Can. J. Zool.*, 57: 486-498.

- AUNGSUCHAWAN, S, CL BROWDY & B WITHYACHUMNARNKUL. 2011. Sperm capacitation of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Res.*, 42: 188-195.
- BARROS, C, E DUPRÉ & L VIVEIROS. 1986. Sperm-egg interactions in the shrimp *Rhynchocinetes typus*. *Gamete Res.*, 14: 171-180.
- BAUER, RT. 1991. Sperm transfer and storage structures in penaeoid shrimp: a functional and phylogenetic perspective. In: BAUER, RT & JW MARTIN (eds.). *Crustacean Sexual Biology*. Columbia University Press, USA, Chap 11: 183-207.
- BAUER, RT & CE CASH. 1991. Spermatophore structure and anatomy of the ejaculatory duct in *Penaeus setiferus*, *P. duorarum* and *P. aztecus* (Crustacea: Decapoda): homologies and functional significance. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 110(2): 144-162.
- BAUER, RT, & LJ MIN. 1993. Spermatophores and plug substance of the marine shrimp *Trachypenaeus similis* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae): formation in the male reproductive tract and disposition in the inseminated female. *Biol. Bull.*, 185: 174-185.
- BAUER, RT & GJ HOLT. 1998. Simultaneous hermaphroditism in the marine shrimp *Lysmata wurdemanni* (Caridea: Hippolytidae): an undescribed sexual system in the decapod Crustacea. *Mar. Biol.*, 132: 223-235.
- BAUER, RT & M THIEL. 2011. First description of a pure-search mating system and protandry in the shrimp *Rhynchocinetes uritai* (Decapoda: Caridea). *J. Crust. Biol.*, 31(2): 286-295.
- BRACKEN, HD, A TOON, DL FELDER, JW MARTIN, M FINLEY J RASMUSSEN, F PALERO & KA CRANDALL. 2009. The decapod tree of life: compiling the



- data and moving toward a consensus of decapod evolution. *Arthropod. Syst. Phylogeny*, 67(1): 99-116.
- BRACKEN, HD, S DE GRAVE, A TOON, DL FELDER & KA CRANDALL. 2010. Phylogenetic position, systematic status, and divergence time of the Procarididea (Crustacea: Decapoda). *Zool. Scr.*, 39(2): 198-212.
- BRAGA, A, CL NAKAYAMA, JG MARTINS, EP COLARES & W WASIELESKY. 2010. Spermatophore quality of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda, Dendrobranchiata) broodstock fed with different maturation diets. *Aquaculture*, 307: 44-48.
- BRAGA, A, DLA LOPES, D KRUMMENAUER, LH POERSCH & W WASIELESKY. 2011. A comparison of the reproductive performance of the wild pink shrimp species *Farfantepenaeus paulensis* and *Farfantepenaeus brasiliensis* in captivity. *J. Shellfish Res.*, 30(3): 963-967.
- BRAGA, A, CL NAKAYAMA, L POERSCH & W WASIELESKY. 2013a. Unistellate spermatozoa of decapods: comparative evaluation and evolution of the morphology. *Zoomorphology*, 132: 261-284.
- BRAGA, A, CL NAKAYAMA, L SUITA DE CASTRO & W WASIELESKY. 2013b. Spermatozoa ultrastructure of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda: Dendrobranchiata). *Acta Zool.*, 94: 119-124.
- BRAY, WA & AL LAWRENCE. 1992. Reproduction of *Penaeus* species in captivity. In: FAST, A & LJ LESTER (eds.). *Marine shrimp culture: principles and practices*. Elsevier Science Publishers B.V., The Netherlands, Chap. 5: 93-169.
- BRISSON, S. 1986. Observation on the courtship of *Penaeus brasiliensis*. *Aquaculture*, 53: 75-78.

- BROWDY, CL. 1992. A review of the reproductive biology of *Penaeus* species: perspectives on controlled shrimp maturation systems for high quality nauplii production. In: WYBAN, J (ed.). Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. Baton Rouge: World Aquaculture Society, USA, Chap. 29: 22-51.
- BRUSCA, RC & GJ BRUSCA. 2003. Invertebrados. 2ª ed. São Paulo, Ed. Guanabara Koogan. 936p.
- BURKENROAD, MD. 1981. The higher taxonomy and evolution of Decapoda (Crustacea). *Trans. San Diego Soc. Nat. Hist.*, 19: 251-268.
- BUTCHER, AR & DR FIELDER. 1994. The reproductive anatomy of male freshwater prawns *Macrobrachium australiense* (Holthuis, 1890) in southeast Queensland. *Invertebr. Reprod. Dev.*, 26(3): 205-212.
- CEBALLOS-VÁZQUEZ, BP, B APARICIO-SIMÓN, E PALACIOS & IS RACOTTA. 2004. Sperm quality over consecutive spermatophore regeneration in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.*, 35(2): 178-188.
- CERENIUS, L & K SÖDERHÄLL. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.*, 198: 116-126.
- CHAMBERLAIN, G, GX JOHNSON & DL LEWIS. 1983. Swelling and melanization of the male reproductive system of captive adult penaeid shrimp. *J. World Maricult. Soc.*, 14: 135-136.
- CHEN, TI, JD GREEN & WH CLARK. 1994. Sperm penetration of the vitelline envelope of *Sicyonia ingentis* eggs is mediated by a trypsin-like lysin of acrosomal vesicle origin. *Dev. Growth Differ.*, 36(3): 259-273.
- CHOW, S & P SANDIFER. 2001. Sperm-egg interaction in the palaemonid shrimp *Palaemonetes vulgaris*. *Fisheries Sci.*, 67: 370-372.

- CHOW, S, MM DOUGHERTY, WJ DOUGHERTY & PA SANDIFER. 1991. Spermatophore formation in the white shrimps *Penaeus setiferus* and *P. vannamei*. *J. Crust. Biol.*, 11(2): 201-216.
- CHU, KH, LM TSANG, KY MA, T-Y CHAN & PKL NG. 2009. Decapod phylogeny: what can protein-coding genes tell us? In: MARTIN, JW, KA CRANDALL & DL FELDER (eds.). Decapod crustacean phylogenetics. Crustacean issues 18. Taylor and Francis/CRC Press, USA, Chap. 6: 90-99.
- CLARK, WH & FJ GRIFFIN. 1988. The morphology and physiology of the acrosome reaction in the sperm of the Decapod, *Sicyonia ingentis*. *Develop. Growth Differ.*, 30(5): 451-462.
- CLARK, WH, MC KLEVE & AI YUDIN. 1981. An acrosome reaction in natantian sperm. *Dev. Growth Differ.*, 30(5): 451-462.
- COBOS, V, V DÍAZ, JEG RASO & ME MANJÓN-CABEZA. 2011. The male reproductive system of *Hippolyte inermis* Leach 1815 (Decapoda, Caridea). *Helgol. Mar. Res.*, 65: 17-24.
- CUARTAS, EI & LG SOUSA. 2007. Ultrastructural study of the spermatophores and spermatozoa in *Uca uruguayensis* (Decapoda, Brachyura, Ocypodidae). *Biociências*, 15(1): 21-28.
- DALL, W, BJ HILL, OC ROTH LISBERG & DJ STAPLES. 1990. The biology of the Penaeidae. In: BLAXTER, JHS & AJ SOUTHWARD (eds.). *Advances in Marine Biology*. Academic Press, UK, volume 27, 489p.
- DALLAI, R, D MERCATI, Y BU & YW YIN. 2010a. Spermatogenesis and sperm structure of *Acerella muscorum* (Ionescu, 1930) (Hexapoda, Protura). *Tissue Cell*, 42(2): 97-104.

- DALLAI, R, D MERCATI, Y BU, YW YIN, G CALLAINI & MG RIPARBELLI. 2010b. The spermatogenesis and sperm structure of *Acerentomon microrhinus* (Protura, Hexapoda) with considerations on the phylogenetic position of the taxon. *Zoomorphology*, 129: 61-80.
- DEMESTRE, M & JM FORTUÑO. 1992. Reproduction of the deep-water shrimp *Aristeus antennatus* (Decapoda: Dendrobranchiata). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 88: 41-51.
- DIAMOND, S, A POWELL, RJ SHIELDS & AF ROWLEY. 2008. Is spermatophore melanisation in captive shrimp (*Litopenaeus vannamei*) a result of an auto-immune response? *Aquaculture*, 285: 14-18.
- DÍAZ, AC, AVF GIMENEZ, NS HARÁN & JL FENUCCI. 2001. Reproductive performance of male argentine red shrimp *Pleoticus muelleri* Bate (Decapoda, Penaeoidea) in culture conditions. *J. World Aquac. Soc.*, 32: 236–242.
- D'INCAO, F. 1991. Pesca e biologia de *Penaeus paulensis* na Lagoa dos Patos. *Atlântica*, 13(1): 159-169.
- DOUGHERTY, WJ & MM DOUGHERTY. 1989. Electron microscopical and histochemical observations on melanized sperm and spermatophores of pond-cultured shrimp, *Penaeus vannamei*. *J. Invertebrat. Pathol.*, 54: 331-343.
- DOUGHERTY, WJ, MM DOUGHERTY & SG HARRIS. 1986. Ultrastructural and histochemical observations on electroejaculated spermatophores of the palaemonid shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*. *Tissue Cell*, 18(5): 709-724.
- DUPRÉ, E & C BARROS. 1983. Fine structure of the mature spermatozoon of *Rhynchocinetes typus*, Crustacea Decapod. *Gamete Res.*, 7: 1-18.

- FELGENHAUER, BE & LG ABELE. 1991. Morphological diversity of decapod spermatozoa. In: BAUER, RT & JW MARTIN (eds.). Crustacean Sexual Biology. Columbia University Press, USA. Chap. 18: 322–341.
- FELGENHAUER, BE, LG ABELE & W KING. 1988. Reproductive morphology of the anchialine shrimp *Procaris ascensionis* (Decapoda: Procarididae). *J. Crust. Biol.*, 8(3): 333-339.
- FERNANDES, AB. 2013. Morfologia e criopreservação do espermatozoide do camarão branco *Litopenaeus schmitti* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Tese de doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil. 57p.
- FRANSEN, CHJM & S DE GRAVE. 2009. Evolution and radiation of shrimp-like decapods: an overview. In: MARTIN, JW, KA CRANDALL & DL FELDER (eds.). Decapod crustacean phylogenetics. Crustacean issues 18. Taylor and Francis/CRC Press, USA, Chap. 12: 245-259.
- GARDA, AA, GR COLLI, O AGUIAR-JÚNIOR, SM RECCO-PIMENTEL & SN BÁO. 2002. The ultrastructure of the spermatozoa of *Epipedobates flavopictus* (Amphibia, Anura, Dendrobatidae), with comments on its evolutionary significance. *Tissue Cell*, 34(5): 356-364.
- GAXIOLA, G, P GALLARDO & N SIMÕES. 2010. A red shrimp, *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817), larvae feeding regime based on live food. *J. World Aquacult. Soc.*, 41: 402-410.
- GOIMIER, Y, C PASCUAL, A SÁNCHEZ, G GAXIOLA, A SÁNCHEZ & C ROSAS. 2006. Relation between reproductive, physiological, and immunological condition of *Litopenaeus setiferus* pre-adult males fed different dietary protein levels (Crustacea; Penaeidae). *Anim. Reprod. Sci.*, 92: 193–208.

- GRIFFIN, FJ, WH CLARK, JH CROWE & LM CROWE. 1987. Intracellular pH decrease during the *in vitro* induction of the acrosome reaction in the sperm of *Sicyonia ingentis*. *Biol. Bull.*, 173: 311-323.
- GRIFFIN, FJ, K SHIGEKAWA & WH CLARK. 1988. Formation and structure of the acrosomal filament in the sperm of *Sicyonia ingentis*. *J. Exp. Zool.*, 246: 94-102.
- GUINOT, D, BGM JAMIESON & BR FORGES. 1994. Relationship of Homolidae and Dromiidae: evidence from spermatozoal ultrastructure (Crustacea, Decapoda). *Acta Zool.*, 75(3): 255-267.
- HALANYCH, KM. 2004. The new view of animal phylogeny. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 35: 229-256.
- HARRIS, EGS & P SANDIFER. 1986. Sperm production and the effects of the electrically induced spermatophore expulsion in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Crust. Biol.*, 6: 633-647.
- HEITZMANN, JC, A DITER & AQUACOP. 1993. Spermatophore formation in the white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone 1931: dependence on the intermoult cycle. *Aquaculture*, 116: 91-98.
- HENDELBERG, J. 1986. The phylogenetic significance of sperm morphology in the Platyhelminthes. *Hydrobiologia*, 132: 53-58.
- HICKMAN, CP, LS ROBERTS, SL KEEN, DJ EISENHOUR, A LARSON & H L'ANSON. 2011. Integrated principles of zoology. 15<sup>th</sup> ed. New York, McGraw Hill Publishers. 402p.
- JAMIESON, BGM. 1984. A phenetic and cladistics study of spermatozoal ultrastructure in the Oligochaeta (Annelida). *Hidrobiologia*, 115: 3-13.

- JAMIESON, BGM. 1991. Ultrastructure and phylogeny of crustacean spermatozoa. *Mem. Queensl. Mus.*, 31: 109-142.
- JAMIESON, BGM. 1994. Phylogeny of the Brachyura with particular reference to the Podotremate: evidence from a review of spermatozoal ultrastructure (Crustacea, Decapoda). *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 345: 3737-393.
- JAMIESON, BGM & JM HEALY. 1992. The phylogenetic position of the Tuatara, *Sphenodon* (Sphenodontida, Amniota), as indicated by cladistics analysis of the ultrastructure of spermatozoa. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 335: 207-219.
- JAMIESON, BGM & CC TUDGE. 1990. Dorippids are Heterotremata: evidence from ultrastructure of the spermatozoa of *Neodorippe astute* (Dorippidae) and *Portunus pelagicus* (Portunidae) Brachyura: Decapoda. *Mar. Biol.*, 106: 347-354.
- JAMIESON, BGM & CC TUDGE. 2000. Crustacea-Decapoda. In: ADIYODI, KG, RG ADIYODI & BGM JAMIESON (eds.). Reproductive biology of invertebrates. Progress in male gamete ultrastructure and phylogeny, volume 9C. Wiley, UK, Chap. 1: 1-95.
- JAMIESON, BGM, D GUINOT & B RICHER DE FORGES. 1995. Phylogeny of the Brachyura (Crustacea, Decapoda): evidence from spermatozoal ultrastructure. In: JAMIESON, BGM, J AUSIO & J-L JUSTINE (eds.). Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle, France, Chap. 18: 265-283.
- JARMAN, SN, S NICOL, NG ELLIOTT & A McMINN. 2000. 28S rDNA evolution in the Eumalacostraca and the phylogenetic position of krill. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 17(1): 26-36.

- KANG, X, S GE, M GUO, G LIU & S MU. 2008. A transmission electron microscopy investigation: the membrane complex in spermatogenesis of *Fenneropenaeus chinensis*. *Cytotechnology*, 56: 113-121.
- KIM, DH, Q JO, JH CHOI, SJ YUN, TY OH, BK KIM & C HAN. 2003. Sperm structure of the pandalid shrimp *Pandalopsis japonica* (Decapoda, Pandalidae). *J. Crust. Biol.*, 23(1): 23-32.
- KING, JE. 1948. A study of the reproductive organs of the common marine shrimp, *Penaeus setiferus* (Linnaeus). *Biol. Bull.*, 94: 244-262.
- KLANN, AE, T BIRD, AV PERETTI, AV GROMOV & G ALBERTI. 2009. Ultrastructure of spermatozoa of solifuges (Arachnida, Solifugae): possible characters for their phylogeny. *Tissue Cell*, 41: 91-103.
- KLAUS, S & D BRANDIS. 2011. Evolution of sperm morphology in potamid freshwater crabs (Crustacea: Brachyura: Potamoidea). *Zool. J. Linn. Soc.*, 161: 53-63.
- KLEVE, MG, AL YUDIN & WH CLARK. 1980. Fine structure of the unistellate sperm of the shrimp, *Sicyonia ingentis* (Natantia). *Tissue Cell*, 12: 29-45.
- KOEHLER, LD. 1979. A unique case of cytodifferentiation: spermiogenesis of the prawn, *Palaemonetes paludosus*. *J. Ultrastruct. Res.*, 69: 109-120.
- KRUEVAISAYAWAN, H, R VANICHVIRIYAKIT, W WEERACHATYANUKUL, S IAMSAARD, B WITHYACHUMNARNKUL, A BASAK, N TANPHAICHITR & P SOBHON. 2008. Induction of the acrosome reaction in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, requires sperm trypsin-like enzyme activity. *Biol. Reprod.*, 79(1): 134-141.



- LEUNG-TRUJILLO, JR & AL LAWRENCE. 1987. Observations on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions. *Aquaculture*, 65: 363–370.
- LEUNG-TRUJILLO, JR & AL LAWRENCE. 1991. Spermatophore generation times in *Penaeus setiferus*, *P. vannamei*, and *P. stylirostris*. *J. World Aquac. Soc.*, 22(4): 244-251.
- LINDSAY, LL & WH CLARK. 1992. Preloading of micromolar intracellular  $\text{Ca}^{+2}$  during capacitation of *Sicyonia ingentis* sperm, and the role of the  $\text{pH}_i$  decrease during the acrosome reaction. *J. Exp. Zool.*, 262(2): 219-229.
- LINO-NETO, J & H DOLDER. 2001. Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera, Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zool. Scripta*, 20(2): 89-96.
- LYNN, JW & WH CLARK. 1983a. A morphological examination of sperm-egg interaction in the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biol. Bull.*, 164: 446-458.
- LYNN, JW & WH CLARK. 1983b. The fine structure of the mature sperm of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biol. Bull.*, 164: 459-470.
- MA, KY, TY CHAN & KH CHU. 2009. Phylogeny of penaeoid shrimps (Decapoda: Penaeoidea) inferred from nuclear protein-coding genes. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 53: 45-55.
- MALEK, SRA & M BAWAB. 1974a. The formation of the spermatophore in *Penaeus kerathurus* (Forskål, 1775) (Decapoda, Penaeidae). I. The initial formation of a sperm mass. *Crustaceana*, 26(3): 273-285.

- MALEK, SRA & M BAWAB. 1974b. The formation of the spermatophore in *Penaeus kerathurus* (Forskål, 1775) (Decapoda, Penaeidae). II. The deposition of the main layers of the body and of the wing. *Crustaceana*, 27(1): 73-83.
- MANJÓN-CABEZA, ME, V COBOS & JEG RASO. 2011. The reproductive system of *Hippolyte niezabitowskii*. *Zoology*, 114: 140-149.
- MARCHIORI, MA & MH BOFF. 1983. Induced maturation, spawning and larvae culture of the pink shrimp *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967. *Mem. Asoc. Latinoam. Acuicult.*, 5: 331-337.
- MARTIN, JW & GE DAVIS. 2001. An updated classification of the recent Crustacea. *Natur. Hist. Mus. Los Angeles County*, 39: 1-124.
- MEDINA, A. 1994. Spermiogenesis and sperm structure in the shrimp *Parapenaeus longirostris* (Crustacea: Dendrobranchiata): comparative aspects among decapods. *Mar. Biol.*, 119: 449-460.
- MEDINA, A. 1995a. Spermatozoal ultrastructure in Dendrobranchiata (Crustacea, Decapoda): taxonomic and phylogenetic considerations. In: JAMIESON, BGM, J AUSIO & J-L JUSTINE (eds.). *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy*. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle, France, Chap. 15: 231-242.
- MEDINA, A. 1995b. The atypical sperm morphologies of *Aristeus antennatus* and *Aristaemorpha foliacea* (Crustacea, Dendrobranchiata, Aristeidae) and their phylogenetic significance. In: JAMIESON, BGM, J AUSIO & J-L JUSTINE (eds.). *Advances in spermatozoa phylogeny and taxonomy*. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle, France, Chap. 16: 161-165.

- MEDINA, A & A RODRIGUEZ. 1992. Spermiogenesis and sperm structure in the crab *Uca tangeri* (Crustacea, Brachyura), with special reference to the acrosome differentiation. *Zoomorphology*, 111: 161-165.
- MEDINA, A, G MOURENTE, L ROSA, A SANTOS & A RODRIGUEZ. 1994a. Spermatozoal ultrastructure of *Penaeus kerathurus* and *Penaeus japonicus* (Crustacea, Dendrobranchiata). *Zoomorphology*, 114:161-167.
- MEDINA, A, IL LA ROSA & A SANTOS. 1994b. Ultrastructural comparison of the spermatozoa of *Sicyonia carinata* (Sicyoniidae) and *Penaeopsis serrata* (Penaeidae) shrimp (Crustacea, Dendrobranchiata), with particular emphasis on the acrosomal structure. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 26(3): 395-403.
- MEDINA, A, C MEGINA, FJ ABASCAL & A CALZADA. 2003. The sperm ultrastructure of *Merluccius merluccius* (Teleostei, Gadiformes): phylogenetic considerations. *Acta Zool.*, 84: 131-137.
- MEDINA, A, E GARCÍA-ISARCH, I SOBRINHO & FJ ABASCAL. 2006a. Ultrastructure of the spermatozoa of *Aristaeopsis edwardsiana* and *Aristeus varidens* (Crustacea, Dendrobranchiata, Aristeidae). *Zoomorphology*, 125: 39-46.
- MEDINA, A, MA SCELZO & CC TUDGE. 2006b. Spermatozoal ultrastructure in three Atlantic solenocerid shrimps (Decapoda, Dendrobranchiata). *J. Morphol.*, 267: 300-307.
- MOHAMED, KS & AD DIWAN. 1993. Spermatogenesis and spermatophore formation in the indian White prawn *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. *J. Mar. Biol. Ass. India*, 35: 180-192.
- MUSCO, L, A GIANGRANDE, M GHERARDI, E LEPORE, M MERCURIO & M SCISCIOLI. 2008. Sperm ultra-structure of *Odontosyllis ctenostoma*

(Polychaeta: Syllidae) with inferences on syllid phylogeny and reproductive biology. *Sci. Mar.*, 72(3): 421-427.

NAKAYAMA, C, S PEIXOTO, D LOPES, G VITA, D KRUMMENAUER, G FOES, RO CAVALLI & W WASIELESKY. 2008. Métodos de extrusão manual e elétrica dos espermatóforos de reprodutores selvagens do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda: Penaeidae). *Cienc. Rural*, 38(7): 2018-2022.

NUNES, ET, AA BRAGA, DC SANTOS & MI CAMARGO-MATHIAS. 2010. Cytodifferentiation during the spermatogenesis of the hermaphrodite Caridea *Exhippolysmata oplophoroides*. *Micron*, 41: 585-591.

PAPATHANASSIOU, E & PE KING. 1984. Ultrastructure studies on gametogenesis of the prawn *Palaemon serratus* (Pennant). II. Spermiogenesis. *Acta Zool.*, 65: 33-40.

PARNES, S, S RAVIV, A SHECHTER & A SAGI. 2006. Males also have their time of the month! Cyclic disposal of old spermatophores, timed by the molt cycle, in a marine shrimp. *J. Exp. Biol.*, 209: 4974-4983.

PASCUAL, C, E VALERA, C RE-REGIS, G GAXIOLA, A SANCHEZ, L RAMOS, LA SOTO & C ROSAS. 1998. Effect of temperature on reproductive tract condition of *Penaeus setiferus* adult males. *J. World Aquacult. Soc.*, 29: 477-484.

PASCUAL, C, A SÁNCHEZ, A SÁNCHEZ, F VARGAS-ALBORES, G LeMOULLAC & C ROSAS. 2003. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture*, 218: 637-650.

- PEIXOTO, S, RO CAVALLI, F D'INCAO, W WASIELESKY & AM MILACH. 2002. A comparative study of the ovarian histology of eyestalk ablated and unablated *Farfantepenaeus paulensis* after spawning. *Bol. Inst. Pesca*, 28(1): 71-76.
- PEIXOTO, S, RO CAVALLI, F D'INCAO, AM MILACH & W WASIELESKY. 2003. Ovarian maturation of wild *Farfantepenaeus paulensis* in relation to histological and visual changes. *Aquac. Res.*, 34: 1255-1260.
- PEIXOTO, S, RO CAVALLI & W WASIELESKY. 2005. Recent developments on broodstock maturation and reproduction of *Farfantepenaeus paulensis*. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 48(6): 997-1006.
- PEIXOTO, S, W WASIELESKY & RO CAVALLI. 2011. Broodstock maturation and reproduction of the indigenous pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* in Brazil: an updated review on research and development. *Aquaculture*, 315: 9-15.
- PÉREZ-CASTAÑEDA, R & O DEFEO. 2001. Population variability of four sympatric penaeid shrimp (*Farfantepenaeus* spp.) in a tropical coastal lagoon of Mexico. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.*, 52: 631-641.
- PÉREZ-FARFANTE, I & B KENSLEY. 1997. Penaeoid and Sergestoid shrimp and prawns of the world: keys and diagnosis for the families and genera. Paris, Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle, 233p.
- PEREZ-VELAZQUEZ, M, WA BRAY, AL LAWRENCE, DM GATLIN & ML GONZÁLEZ-FÉLIX. 2001. Effect of temperature on sperm quality of captive *Litopenaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture*, 198: 209-218.
- POCHON-MASSON, J. 1969. Infrastructure du spermatozoide de *Palaemon elegans* (De Man) (Crustacé, Décápode). *Arch. Zool. Exp. Gen.*, 110: 363-372.

- POERSCH, L, RO CAVALLI, W WASIELESKY, JP CASTELLO & S PEIXOTO. 2006. Perspectivas para o desenvolvimento dos cultivos de camarões marinhos no estuário da Lagoa dos Patos, RS. *Ciênc. Rural*, 36: 1337-1343.
- PONGTIPPATEE, P, R VANICHVIRIYAKIT, J CHAVADEJ, P PLODPAI, B PRATOOMCHART, P SOBHON & B WITHYACHUMNARNKUL. 2007. Acrosome reaction in the sperm of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda, Penaeidae). *Aquac. Res.*, 38: 1635-1644.
- QUINTERO, MES & A GARCIA. 1998. Stages of gonadal development in the spotted pink shrimp *Penaeus brasiliensis*. *J. Crustac. Biol.*, 18: 680-685.
- RICHTER, S & G SCHOLTZ. 2001. Phylogenetic analysis of the Malacostraca (Crustacea). *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, 39: 113-136.
- ROSAS, C, A SANCHEZ, MAE CHIMAL, G SALDAÑA, L RAMOS & LA SOTO. 1993. The effect of electrical stimulation on spermatophore regeneration in White shrimp *Penaeus setiferus*. *Aquat. Living Resour.*, 6: 139-144.
- SÁNCHEZ, A, C PASCUAL, A SÁNCHEZ, F VARGAS-ALBORES, GL MOULLAC & C ROSAS. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture*, 198: 13-28.
- SARATHI, M, VPI AHMED, C VENKATESAN, G BALASUBRAMANIAN, J PRABAVATHY & ASS HAMEED. 2007. Comparative study on immune response of *Fenneropenaeus indicus* to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 271: 8-20.
- SCELZO, MA & A MEDINA. 2003. Spermatozoal ultrastructure in *Artemisia longinaris* (Decapoda, Penaeidae). *J. Crust. Biol.*, 23(4): 814-818.

- SCELZO, MA & A MEDINA. 2004. A dendrobranchiate, *Peisos petrunkevitchi* (Decapoda, Sergestidae), with reptant-like sperm: a spermicladistic assessment. *Acta Zool.*, 85: 81-89.
- SCHRAM, FR. 2001. Phylogeny of decapods: moving towards a consensus. *Hydrobiologia*, 449: 1-20.
- SELMI, MG, R BRIZZI & E BIGLIARDI. 1997. Sperm morphology of salamandrids (Amphibia, Urodela): implications for phylogeny and fertilization biology. *Tissue Cell*, 29(6): 651-664.
- SHEN, H, A BRABAND & G SCHOLTZ. 2013. Mitogenomic analysis of decapod crustacean phylogeny corroborates traditional views on their relationships. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 66: 776-789.
- SHIGEKAWA, K & WH CLARK. 1986. Spermiogenesis in the Marine Shrimp, *Sicyonia ingentis*. *Develop. Growth Differ.*, 28(2): 95-112.
- SOKAL, RR & FJ ROHLF. 1995. Biometry. New York, W.H. Freeman and Company. 887p.
- STORCH, V & BGM JAMIESON. 1992. Further spermatological evidence for including the Petastomida (tongue worms) in the Crustacea. *Int. J. Parasitol.*, 22: 95-108.
- SUBRAMONIAM, T. 1991. Chemical composition of spermatophores in decapod crustaceans. In: BAUER, RT & JW MARTIN (eds.). *Crustacean Sexual Biology*. Columbia University Press, USA. Chap 17: 308-321.
- SUBRAMONIAM, T. 1995. Light and electron microscopic studies on the seminal secretions and the vas deferens of the penaeoidean shrimp, *Sicyonia ingentis*. *J. Biosci.*, 20(5): 691-706.

- TALBOT, P, D HOWARD, J LEUNG-TRUJILLO, TW LEE, W-Y LI, H RO & AL LAWRENCE. 1989. Characterization of Male Reproductive Tract Degenerative Syndrome in captive Penaeid shrimp (*Penaeus setiferus*). *Aquaculture*, 78: 365-377.
- TAVARES, C, C SEREJO & JW MARTIN. 2009. A preliminar phylogenetic analysis of the Dendrobranchiata based on morphological characters. In: MARTIN, JW, KA CRANDALL & DL FELDER (eds.). Decapod crustacean phylogenetics. Crustacean issues 18. Taylor and Francis/CRC Press, USA, Chap. 13: 262-279.
- TEROSSI, M, CC TUDGE, LS GRECO & FL MANTELATTO. 2012. A novel spermatozoan ultrastructure in the shrimp *Hippolyte obliquimanus* Dana, 1852 (Decapoda: Caridea: Hippolytidae). *Invertebr. Reprod. Dev.*, 56(4): 299-304.
- TIRELLI, T, D SILVESTRO, D PESSANI & CC TUDGE. 2010. Description of the male reproductive system of *Paguristes eremita* (Anomura, Diogenidae) and its placement in a phylogeny of diogenid species based on spermatozoal and spermatophore ultrastructure. *Zool. Anz.*, 248: 299-312.
- TOON, A, M FINLEY, J STAPLES & KA CRANDALL. 2009. Decapod phylogenetics and molecular evolution. In: MARTIN, JW, KA CRANDALL & DL FELDER (eds.). Decapod crustacean phylogenetics. Crustacean issues 18. Taylor and Francis/CRC Press, USA, Chap. 2: 15-29.
- TSANG, LM, KY MA, ST AHYONG, T-Y CHAN & KH CHU. 2008. Phylogeny of Decapoda using two nuclear protein-coding genes: origin and evolution of the Reptantia. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 48: 359-368.
- TUDGE, CC. 1997. Phylogeny of the Anomura (Decapoda, Crustacea): spermatozoa and spermatophore morphological evidence. *Contrib. Zool.*, 67(2): 125-141.



- TUDGE, CC. 2009. Spermatozoal morphology and its bearing on decapod phylogeny. In: MARTIN, JW, KA CRANDALL & DL FELDER (eds.). Decapod crustacean phylogenetics. Crustacean issues 18. Taylor and Francis/CRC Press, USA, Chap. 7: 101-119.
- VALENTINI, H, F D'INCAO, LF RODRIGUES, JE REBELO NETO & E RAHN. 1991. Análise da pesca do camarão-rosa (*P. brasiliensis* e *P. paulensis*) nas regiões Sudeste e Sul do Brasil. *Atlântica*, 13: 143-157.
- VANICHVIRIYAKIT, R, H KRUEVAISAYAWAN, W WEERACHATYANUKUL, P TAWIPREEDA, B WITHYACHUMNARNKUL, B PRATOOMCHAT, J CHAVADEJ & P SOBHON. 2004. Molecular modification of *Penaeus monodon* sperm in female thelycum and its consequente responses. *Mol. Reprod. Dev.*, 69: 356-363.
- VARGAS-ALBORES, F & G YEPIZ-PLASCENCIA. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture*, 191: 13-21.
- VIEIRA, GHC, LD CUNHA, DM SCHELTINGA, F GLAW, GR COLLI & SN BÁO. 2007. Sperm ultrastructure of hoplocercid and oplurid lizards (Sauropsida, Squamata, Iguana) and the phylogeny of Iguania. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, 45(3): 230-241.
- VISCONTI, PE, JL BAILEY, GD MOORE, D PAN, P OLDS-CLARKE & GS KOPF. 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*, 121: 1129-1137.
- VISCONTI, PE, XP NING, MW FORNÉS, JG ALVAREZ, P STEIN, SA CONNORS & GS KOPF. 1999. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in

mammalian sperm: cholesterol release signals and increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev. Biol.*, 214: 429-443.

WANG, Q, M MISAMORE, CQ JIANG & CL BROWDY. 1995. Egg water induced reaction and biostain assay of sperm from marine shrimp *Penaeus vannamei*: dietary effects on sperm quality. *J. World Aquacult. Soc.*, 26(3): 261-271.

WIKRAMANAYAKE, AH & WH CLARK. 1994. Two extracellular matrices from oocytes of the marine shrimp *Sicyonia ingentis* that independently mediate only primary or secondary sperm binding. *Dev. Growth Differ.*, 36: 89-101.

WIKRAMANAYAKE, AH, KR UHLINGER, FJ GRIFFIN & WH CLARK. 1992. Sperm of the shrimp *Sicyonia ingentis* undergo a bi-phasic capacitation accompanied by morphology changes. *Develop. Growth. & Differ.*, 34(3): 347-355.