

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 27/02/2027.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP – CAUNESP

**Os desafios na produção de linhagens
monossexo do camarão *Macrobrachium
rosenbergii* (De Man, 1879) no Brasil**

Marina Machado da Costa

Jaboticabal-SP
2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

Os desafios na produção de linhagens monossexo do camarão *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) no Brasil

Marina Machado da Costa

Orientador: Dr. Wagner C. Valenti

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora

Jaboticabal, SP

2025

C837d

Costa, Marina Machado da

Os desafios na produção de linhagens monossexo do camarão
Macrobrachium rosenbergii (De Man, 1879) no Brasil / Marina
Machado da Costa. -- Jaboticabal, 2025

106 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal

Orientador: Wagner Cotroni Valenti

1. Genética. 2. Cultivo celular. 3. Reversão sexual. 4. Histologia.
I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Os desafios na produção de linhagens monossexo do camarão *Macrobrachium rosenbergii* no Brasil.

AUTORA: MARINA MACHADO DA COSTA

ORIENTADOR: WAGNER COTRONI VALENTI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Aquicultura, pela Comissão Examinadora:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Wagner", is positioned above the name of the virtual participant.

Prof. Dr. WAGNER COTRONI VALENTI (Participação Virtual)
Setor de Carcinicultura / Centro de Aquicultura da Unesp, Caunesp, Jaboticabal-SP

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Maria Lucia", is positioned above the name of the virtual participant.

Profa. Dra. MARIA LUCIA NEGREIROS FRANSOZO (Participação Virtual)
Departamento de Biodiversidade e Bioestatística / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, Botucatu/SP



Documento assinado digitalmente
LUCAS REZENDE PENIDO PASCHOAL
Data: 21/03/2025 17:55:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pós-Doc. LUCAS REZENDE PENIDO PASCHOAL (Participação Virtual)
Departamento de Biologia / FCAV, UNESP, Jaboticabal/SP

Pós-Doc. CAROLINA HELOISA DE SOUZA BORGES (Participação Virtual)
Centro de Aquicultura da UNESP, / UNESP, Jaboticabal/SP



Documento assinado digitalmente
CAROLINA HELOISA DE SOUZA BORGES
Data: 24/03/2025 06:40:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

Pós-doc JOÃO ALBERTO FARINELLI PANTALEÃO (Participação Virtual)
Setor de Biodiversidade / Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), Universidade Federal de Alagoas (UFAL)

Documento assinado digitalmente
 JOAO ALBERTO FARINELLI PANTALEAO
Data: 21/03/2025 08:41:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jaboticabal, 27 de fevereiro de 2025



“MANY OF THE TRUTHS THAT WE CLING TO DEPEND ON
OUR POINT OF VIEW”

STAR WARS: EP VI - RETURN OF THE JEDI.

Sumário

Apoio financeiro.....	4
Agradecimentos	4
Introdução	7
Referências	12
Capítulo I.	15
Identificação genética do sexo em <i>Macrobrachium rosenbergii</i> (De Man, 1879): validação de primers em uma população brasileira	15
Resumo	16
Introdução	17
Material e métodos	20
Resultados	24
Discussão.....	27
Referências	30
.....	33
Capítulo II.	33
Desafios no cultivo de células da glândula androgênica de <i>Macrobrachium rosenbergii</i> (De Man, 1879): um estudo de viabilidade biotecnológica	33
Resumo	34
Introdução	35
Animais.....	37
Isolamento e cultivo das células da AG	38
Extração e isolamento de RNA.....	41
Análise de PCR convencional.....	41
Resultados	42
Cultivo celular e descrição morfológica da hAG	42
Confirmação pela expressão gênica e análise de PCNA.....	44
Discussão.....	45
Referências	48
.....	51
Capítulo III.	51
Reversão Sexual em <i>Macrobrachium rosenbergii</i> (De Man, 1879): aplicações no Brasil.....	51
Resumo	52
Introdução	

Material e Métodos	59
Animais.....	59
Grupos experimentais	60
Reversão sexual.....	60
Extração do DNA	61
Marcadores moleculares (primers)	61
Larvicultura.....	61
Resultados	62
Grupos experimentais	62
Análise Molecular.....	66
Discussão.....	68
Referências	71
.....	76
Capítulo IV.....	76
Resumo	77
Introdução	78
Contagem espermática	80
Resultados Comparação histológica de machos normais e neo-machos	81
Contagem espermática	90
Discussão.....	92
Referencias	95
Considerações finais	99

Apoio financeiro

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de fomento, processo nº 140792/2021-0 MAI/DAI-CNPq.

A Empresa Camarões Brasil pela reserva técnica vinculada ao processo nº 140792/2021-0 MAI/DAI-CNPq.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Genética em Aquicultura e Conservação (LaGeAC), ao Setor de Carcinicultura do Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp), ao Laboratório de Biotecnologias da Reprodução (LABOR) e ao Laboratório de Morfologia de Invertebrados (IML) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – UNESP Jaboticabal, pela estrutura e suporte para o desenvolvimento do projeto.

Ao meu orientador, Wagner Valenti, pela confiança, autonomia e liberdade concedida ao longo dos últimos quatro anos, que me permitiram trilhar meu próprio caminho, construir parcerias, abrir novas portas, enfrentar desafios e aprender com meus próprios erros e acertos.

Aos sócios-proprietários e amigos da Rodrigues e Amorim LTDA, pela oportunidade, pelos ensinamentos e pelo desafio. A confiança é uma aposta!

À coorientação indireta dos professores Maíra Bianchi, Tiago de Bem, Diogo Teruo, Zara e Rita de Cássia. Aos preveters Breno e Andressa e aos pós-docs John, BigCarol, Arno Juliano e Lucas e, aos técnicos Marcinha, Roberta e Roberto. Seja em uma conversa no corredor ou nas inúmeras vezes em que tiveram a paciência de me ensinar – uma, duas, incontáveis vezes – seja na bancada ou em uma simples configuração do microscópio, sou imensamente grata.

Ao meu coorientado, Alexandre. Obrigada pela paciência, dedicação e por todas as vezes que sentou para ouvir as novidades ou lamentações do trabalho.

Às grandes amigas que o Caunesp me deu, Analu e Little. Vocês foram meus pilares neste caos. Analu, nunca imaginei que Dourados, a cidade onde fiz faculdade, acabaria nos conectando tanto tempo depois. O destino, de alguma forma, nos fez cruzar caminhos no momento certo, e sou imensamente grata por ser sua amiga. Little, sua amizade foi um presente tão grande quanto as histórias que vivemos e lamentamos juntas. Vocês vibraram com as vitórias e transformaram essa jornada em algo suportável.

Aos meus amigos de longa data, que sempre estiveram ao meu lado, independentemente dos altos e baixos. Vocês são incríveis, e cada momento que compartilhamos fizeram parte dessa caminhada. A amizade de vocês é uma das coisas que mais prezo, e sou grata por cada risada, apoio e por me manterem no caminho quando eu mais precisei. Eu amo vocês!

À minha família, pelo apoio e incentivo ao longo dessa trajetória que começou bem longe daqui. Que minha mãe siga orgulhosa ao dizer que sua filha caçula, além de formada, é doutora (Amém!).

À minha avó, que aos 82 anos segue me incentivando a estudar, não desistir, ter fé em mim e entende que estudo também é trabalho!

Aos meus sobrinhos e sobrinhos-netos, sou grata por me derem o título de tia legal – só me falta a grana!

À minha orientadora de mestrado, Maria Lucia, minha inspiração na pesquisa. Obrigada por aquele café em um sábado cinzento, que iluminou um momento de dúvida e incerteza. Seus ensinamentos e sua confiança em mim me ajudaram a redescobrir minha força e nunca duvidar da minha capacidade. Você não apenas me ensinou ciência, mas também me mostrou o verdadeiro significado de orientação e dedicação. Sou imensamente grata por tudo o que aprendi com você e pela marca que deixou em minha trajetória.

À minha companheira de vida, Franciele, meu porto seguro em todos os momentos. Obrigada por nunca soltar minha mão, por me incentivar a seguir em frente, mesmo quando tudo parecia desabar, e por me acolher com tanto amor. Suas palavras de encorajamento e sua presença me deram forças para enfrentar os dias mais difíceis. Você esteve ao meu lado em cada passo, desde as noites sem fim a preparar comidas reconfortantes quando eu chegava em casa após mais um dia de experimentos frustrados e, por acreditar em mim quando eu mesma duvidava. Você é a razão pela qual eu não desisti, e este sucesso é tão seu quanto meu.

À família que minha companheira me deu, obrigada por me acolherem como filha, neta, sobrinha de vocês e me receberem de braços abertos. Me fizeram sentir parte de algo maior. O amor, força e lealdade de vocês me inspiram.

Obrigada a todos que tornaram esta tese possível. Foi um longo caminho, com muitos, muitos domingos e feriados no laboratório e, muitas vezes acompanhada de pessoas que fizeram essa tese sair. Sou grata por tudo que aprendi e pelo quanto amadureci durante o processo.

Encerramos!

Dedico esta tese a todos os novos cientistas. Que nós nunca percamos o brilho pela pesquisa e que sejamos melhores do que os exemplos que passaram pelo nosso caminho.
Parte de ser cientista é aceitar certas realidades.

Introdução

Os crustáceos estão entre os organismos mais bem-sucedidos na colonização de novos habitats. Aproximadamente 28% dos organismos exóticos registrados na costa da América do Norte pertencem a esse grupo, o que evidencia sua notável capacidade de dispersão (Ruiz et al., 2000). Diversos fatores contribuem para esse sucesso, incluindo o tamanho reduzido em estágios juvenis, a presença de um exoesqueleto resistente e a alta tolerância a variações de temperatura e salinidade (Ruiz et al., 2000; MacIsaac et al., 2001).

A relevância econômica de diversas espécies levou à sua introdução intencional para fins aquícolas em diferentes países (Naylor et al., 2001; Minchin, 2007). No Brasil, o camarão-da-malásia, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879), uma espécie exótica originária do Sudeste Asiático, foi introduzido em 1977 para impulsionar a carcinicultura (Oliveira & Santos, 2021). introduzido em 1977 com o objetivo de impulsionar a carcinicultura (Oliveira & Santos, 2021). Desde então, essa espécie tem sido registrada em ambientes naturais de oito estados brasileiros, totalizando 43 municípios, com maior incidência nos estados do Pará e Maranhão. Populações estabelecidas vêm sendo monitoradas, como o reservatório de Furnas, localizado entre os municípios de São José da Barra e São João Batista do Glória, em Minas Gerais (Chaves et al., 2023). A dispersão da espécie no Brasil está associada à fuga de indivíduos de viveiros de produção para ambientes naturais, podendo gerar impactos ecológicos sobre espécies nativas e ecossistemas locais (Oliveira & Santos, 2021).

Os camarões do gênero *Macrobrachium* apresentam uma ampla diversidade de estratégias reprodutivas, incluindo espécies totalmente dulcícolas e anfídomas, cujas larvas necessitam de um ambiente estuarino para completar o ciclo de vida (Bauer, 2011; Bauer, 2013). *M. rosenbergii*, assim como a maioria das espécies do gênero *Macrobrachium* Spence Bate, 1868, possui um ciclo de vida anfídromo, no qual os adultos vivem e se reproduzem em água doce, enquanto as larvas precisam de ambientes estuarinos para seu desenvolvimento antes de retornarem ao habitat dulcícola (Bauer, 2011; Bauer, 2013; Bauer, 2023). Esse ciclo migratório é essencial para a sobrevivência da espécie e pode ser influenciado por fatores ambientais e impactos antrópicos, como a construção de barragens e a degradação de habitats fluviais (Bauer, 2011). A necessidade de conexão com estuários restringe sua ocorrência natural (New, 2002), mas, com o desenvolvimento de técnicas para a

produção de pós-larvas (PLs) em cativeiro, ou seja, a carcinicultura, *M. rosenbergii* foi amplamente disseminado para fins aquícolas, incluindo sua introdução no Brasil (New, 2002).

O estabelecimento da carcinicultura de *M. rosenbergii* impulsionou estudos sobre a biologia reprodutiva não só da espécie, como do gênero (David et al., 2018), incluindo estudos moleculares sobre a determinação do sexo. A determinação sexual é genética, com a presença de sistema cromossômico ZZ/ZW (Benzie et al., 2001; Coman et al., 2008; Waiho et al., 2019). Estudos realizados desde a década de 1990 demonstraram que as fêmeas de *M. rosenbergii* possuem cromossomos sexuais ZW, enquanto os machos, os cromossomos ZZ (Sagi, 1990; Malecha et al., 1992; Aflalo et al., 2006). Posteriormente, a identificação de marcadores específicos do sexo permitiu um melhor entendimento desse sistema para a espécie (Ventura et al., 2011; Jiang & Qiu, 2013). Até o momento, os estudos moleculares têm sido direcionados ao aprimoramento da produção monossexo por meio da reversão sexual (Ventura et al., 2009; Ventura et al., 2011; Jiang & Qiu, 2013; Levy et al., 2019; Ma et al., 2019; Megawati, 2021; Liu et al., 2023).

A produção monossexo, seja de machos ou fêmeas, apresenta benefícios econômicos significativos. Os machos, que geralmente alcançam maior peso individual na despesca, são ideais para mercados que priorizam animais grandes e/ou mais bonitos. Por outro lado, o cultivo de fêmeas permite maior densidade de estocagem em razão delas serem menos agressivas e uniformidade no tamanho eliminando a necessidade de despescas seletivas (Levy et al., 2017; Malecha et al., 2010).

Os avanços na manipulação sexual de *M. rosenbergii* demonstram uma trajetória científica que começou com métodos experimentais simples e evoluiu para biotecnologias altamente sofisticadas. As primeiras tentativas foram realizadas por Nagamine et al. (1980a) e Nagamine et al. (1980b), que exploraram tanto a ablação da glândula androgênica (AG) em machos quanto a implantação dessa glândula em fêmeas. No caso da ablação, os machos perderam os apêndices masculinos e desenvolveram gônadas femininas parciais, evidenciando a importância do hormônio semelhante a insulina (IAG) na manutenção de características masculinas. Já a implantação da AG em fêmeas resultou no desenvolvimento de apêndices masculinos, atestando o papel do IAG na masculinização.

A reversão sexual completa foi alcançada posteriormente por Malecha et al. (1992) por meio da implantação de AG em fêmeas (ZW), resultando em neo-machos

totalmente funcionais. Todavia, a taxa de sucesso foi muito baixa (~10%) e a mortalidade elevada, pois a técnica era altamente invasiva. Aflalo et al. (2006), por sua vez, relataram a reversão completa de machos para fêmeas por meio da ablação cirúrgica da AG em animais de estágios iniciais (PLs). Esses métodos pioneiros, embora promissores, apresentavam desafios significativos, como altas taxas de mortalidade, baixa eficiência de reversão e infertilidade dos animais revertidos.

Em 2012, Ventura et al. realizaram a reversão sexual completa de machos (ZZ) para neo-fêmeas utilizando a técnica de RNA de interferência (RNAi). A partir do silenciamento de um gene IAG em PLs, obtiveram-se proles 100% de machos ZZ. Levy et al. (2016), também realizaram avanços significativos ao fazerem uso de células cultivadas da glândula androgênica (AG). Essas células foram injetadas em fêmeas ZW, resultando em *neo-machos* ZW, que, ao cruzarem com fêmeas normais, produziram progênes com 25% de fêmeas WW, 50% de fêmeas ZW e 25% de machos ZZ. As fêmeas WW foram então cruzadas com machos normais ZZ, gerando progênes exclusivamente de fêmeas ZW. Embora eficaz, esse método apresentava limitações devido ao alto custo de produção e à dependência de uma quantidade limitada de células AG por doador. Em uma abordagem subsequente, Levy et al. (2019) eliminaram a etapa do cultivo celular, injetando diretamente células AG suspensas em fêmeas WW, que foram revertidas em machos WW. Esses machos, ao cruzarem com outras fêmeas WW, geraram progênes 100% de fêmeas WW reprodutoras.

Molcho et al. (2020), injetaram células suspensas da AG seguindo protocolo de Levy et al. (2019) em fêmeas e machos WW, gerando três gerações de camarões sem os cromossomos Z, que foram cultivados em policultivo com *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Segundo os autores o método oferece benefícios tanto para a produção quanto para a sustentabilidade, uma vez que resulta em maior densidade de estocagem e promove o cultivo de mais de uma espécie no mesmo espaço. Recentemente, Xu et al. (2022) apresentaram uma nova abordagem utilizando o silenciamento do gene *MroDmrt11E*, sendo eficaz na reversão sexual completa e funcional de machos ZZ para *neo-fêmeas* ZZ. Esses avanços ressaltam o papel central do hormônio IAG na diferenciação sexual de *M. rosenbergii*, permitindo manipulações que direcionam o desenvolvimento sexual tanto para fêmeas como para machos.

As técnicas mais atuais descritas acima têm demonstrado resultados promissores em relação à taxa de reversão e mortalidade reduzida quando

comparadas às técnicas e manipulações anteriores. Entretanto, essas abordagens biotecnológicas dependem de laboratórios altamente equipados e insumos de alto custo, o que as torna economicamente inviáveis para muitos produtores, especialmente em países em desenvolvimento, como o Brasil.

A realidade atual ressalta a necessidade de alternativas mais acessíveis e adaptadas às condições econômicas locais. Assim, este trabalho teve como objetivo contribuir para o desenvolvimento de um protocolo acessível para a produção de cultivos monosssexo de fêmeas de *M. rosenbergii*, alinhado à realidade dos produtores nacionais, sem comprometer a eficácia das técnicas de reversão sexual. Parte-se da hipótese de que é possível desenvolver um protocolo de reversão sexual acessível para *M. rosenbergii*, adequado às condições dos produtores nacionais, garantindo a produção de neo-machos funcionais e a obtenção de fêmeas WW viáveis para cultivos monosssexo.

A tese está estruturada em quatro capítulos. No primeiro capítulo, a hipótese foi a de que o uso de primers específicos para as populações brasileiras pode melhorar a acurácia na diferenciação genética de machos e fêmeas, contribuindo para a otimização do protocolo de reversão sexual. O estudo evidenciou que os primers descritos na literatura apresentaram limitações para a população exótica do camarão-da-malásia no Brasil, destacando a necessidade de desenvolver primers específicos para a identificação genética de camarões ZW, ZZ e WW. Embora um dos primers testados tenha amplificado uma sequência do cromossomo W, ela também amplificou em 16,67% dos machos (4/24), enquanto para a sequência do cromossomo Z, o resultado foi positivo e será possível confirmar a identificação genética de fêmeas WW no capítulo 3. Dessa forma, propôs-se o desenvolvimento de primers que amplifiquem subsequências exclusivas de fêmeas e machos com base no sequenciamento de pools, a fim de garantir maior acurácia na identificação genética da população exótica de *M. rosenbergii* no Brasil e otimizar o protocolo de reversão sexual.

No segundo capítulo, a hipótese testada foi de que as células da glândula androgênica (*hAG*) de *M. rosenbergii* poderiam ser cultivadas em condições controladas, mantendo sua viabilidade e função endócrina, com potencial para substituir o uso de machos doadores na reversão sexual. Contudo, apesar das células da *hAG* não terem proliferado adequadamente em cultura, sua função endócrina foi mantida, sugerindo a liberação do hormônio IAG no meio de cultivo. Esse resultado

indica que, embora o cultivo celular não tenha sido bem-sucedido em termos de proliferação, a atividade hormonal pode ser preservada.

No terceiro capítulo, a hipótese testada foi a de que o uso do extrato da glândula androgênica pode ser uma alternativa acessível e eficaz para a reversão sexual de *M. rosenbergii* quando comparadas as biotecnologias atuais e patentes internacionais. Como resultado, obteve-se a produção de neo-machos ZW que geraram progênes viáveis com identificação genética de fêmeas WW. Uma patente (pedido de patente nº 24CI095) foi submetida para proteger essa metodologia adaptada à realidade brasileira, que reduz custos e viabiliza a produção comercial de populações monossexo de fêmeas.

No quarto e último capítulo, a hipótese foi a de que a reversão sexual em *M. rosenbergii* resulta em diferenças estruturais e funcionais no sistema reprodutor dos neo-machos quando comparados aos machos normais, refletindo adaptações no padrão do sistema reprodutor masculino. Foram evidenciadas diferenças histológicas e funcionais entre machos normais e neo-machos. Os neo-machos apresentaram espermatogênese sincronizada, similar ao ciclo ovariano, com produção espermática inferior e capacidade reprodutiva confirmada pela geração de progênes viáveis. Esses achados confirmam a menor produção espermática, mas também reforçam a condição funcional dos revertidos, destacando a necessidade de otimização dos protocolos para aprimorar a eficiência reprodutiva dos neo-machos. Os avanços apresentados consolidam a reversão sexual como uma ferramenta biotecnológica promissora para a produção na aquicultura nacional, promovendo soluções acessíveis, sustentáveis e competitivas para a produção de *M. rosenbergii* no Brasil.

Considerações finais

O presente estudo abordou aspectos centrais para o avanço da biotecnologia aplicada à produção de populações monossexo de *Macrobrachium rosenbergii*, espécie exótica de origem asiática, atualmente cultivada comercialmente no Brasil. As estratégias desenvolvidas ao longo desta investigação priorizaram soluções viáveis, acessíveis e adaptadas à realidade dos sistemas aquícolas nacionais. Os resultados descritos nos quatro capítulos revelaram avanços relevantes, tanto do ponto de vista científico quanto tecnológico, ao mesmo tempo em que destacaram desafios que ainda precisam ser enfrentados para consolidar a reversão sexual como uma prática eficiente no cultivo dessa espécie exótica.

A integração dos capítulos permitiu uma abordagem abrangente, desde a identificação genética do sexo até a aplicação funcional da reversão sexual, com suporte de análises moleculares, cultivo celular e avaliação morfohistológica de *neo-machos*. No primeiro capítulo, foi evidenciada a limitação dos primers disponíveis na literatura para identificação do cromossomo W em uma população exótica no Brasil, reforçando a necessidade de desenvolver marcadores moleculares específicos, baseados no sequenciamento de amostras locais, com vistas a aumentar a precisão na triagem genotípica e no direcionamento do manejo reprodutivo para a reversão sexual.

No segundo capítulo, observou-se que as células da glândula androgênica (hAG) mantêm atividade secretora em cultivo, com expressão do hormônio IAG, apesar da ausência de proliferação. A tentativa de cultivo celular revelou-se limitada pela acidificação do meio e pela ausência de estímulos à multiplicação, sugerindo que essas células seguem um ciclo funcional definido, com ênfase na secreção hormonal. Embora o cultivo celular da hAG represente uma linha inovadora, sua implementação requer estrutura laboratorial especializada e insumos de alto custo, restringindo sua aplicabilidade imediata em larga escala.

O terceiro capítulo apresentou uma inovação prática ao padronizar uma técnica de reversão sexual baseada na aplicação de extrato da glândula androgênica. Essa abordagem resultou na produção de *neo-machos* ZW, capazes de copular e gerar descendência viável com a ocorrência de fêmeas WW, identificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR). Essa técnica, protegida por depósito de patente (nº 24CI095), representa o primeiro protocolo de reversão sexual bem-sucedido para a espécie introduzida na América Latina e poderá se destacar pela viabilidade econômica e adaptabilidade às condições locais.

No quarto capítulo, as análises morfohistológicas e histoquímicas do sistema reprodutor de *neo-machos* revelaram padrões distintos de organização e funcionalidade quando comparados aos machos normais. Os *neo-machos* apresentaram espermatogênese sincronizada, padrão não descrito para machos normais, com menor produção espermática. Com base nessas observações, foi proposto o conceito de “ciclo testicular”, dividido em três estágios funcionais, semelhante ao padrão descrito para o ciclo ovariano em fêmeas da mesma espécie. Além disso, foi identificada uma possível quarta secreção na região distal do vaso deferente, sem reatividade a proteínas ou polissacarídeos, levantando a hipótese de que seja composta por lipídios (hipótese que poderá ser investigada futuramente por colorações específicas como *Sudan Black* ou *Oil Red O*).

Esses achados reforçam que, embora apresentem características morfohistológicas distintas, os *neo-machos* obtidos por reversão sexual são funcionalmente férteis. A hipótese de que a reversão sexual induz alterações estruturais e funcionais no sistema reprodutor foi confirmada, estabelecendo bases inéditas sobre a fisiologia dos indivíduos revertidos e contribuindo com conhecimento técnico para o aprimoramento da técnica.

Para os próximos estudos, recomenda-se a ampliação do número de indivíduos avaliados, a fim de verificar a consistência dos achados morfofuncionais. O desenvolvimento de primers específicos para identificação precoce do sexo genético, sobretudo entre 5 e 30 dias após a metamorfose, poderá acelerar o processo de seleção e validação da reversão. Análises moleculares e hormonais devem ser incorporadas para elucidar os mecanismos regulatórios da espermatogênese sincronizada e da secreção da glândula androgênica. Também se destaca a importância de avaliar o impacto produtivo da técnica em cultivos comerciais, considerando variáveis como densidade de estocagem, tempo de maturação e a possível adoção de sistemas integrados com outras espécies.

Os resultados apresentados nesta investigação consolidam a reversão sexual como uma ferramenta biotecnológica promissora e tecnicamente viável para o cultivo sustentável de *M. rosenbergii* no Brasil. A técnica proposta supera limitações anteriores relacionadas a custo, infraestrutura e escalabilidade, aproximando o conhecimento científico da realidade do setor produtivo. A viabilidade funcional dos indivíduos revertidos, a confirmação genética das fêmeas WW e o desenvolvimento de um protocolo adaptado às condições locais representam conquistas importantes para o fortalecimento da carcinicultura nacional.

Além de atingir plenamente os objetivos propostos, esta tese resultou no depósito de uma patente e na consolidação de uma técnica passível de adoção em diferentes contextos de produção. O programa de doutorado em tecnologia e inovação (MAI/DAI) foi fundamental para viabilizar a interação entre universidade e setor produtivo, contribuindo para transformar a ciência em tecnologia aplicada e impulsionar a aquicultura brasileira com base em soluções acessíveis, sustentáveis e cientificamente embasadas.

Referencias

- AFALLO, E. D. et al. A novel two-step procedure for mass production of all-male populations of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, v. 256, p. 468-478, 2006.
- ANH, N. T. N. Integration of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* de Man, 1879 and red seaweed *Gracilaria tenuistipitata* under different feeding rates. *Livestock Research for Rural Development*, Cali. v. 31, n. 6, 2019, 6 p.
- BAUER, R. T. Phylogenetic trends in sperm transfer and storage complexity in decapod crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, v. 6, n. 3, p. 313-325, 1986.
- BAUER, R. T. Remarkable shrimps: Adaptations and natural history of the carideans. Norman: University of Oklahoma Press, 2004.
- BUTCHER, A. R.; FIELDER, D. R. The reproductive anatomy of male freshwater prawns *Macrobrachium australiense* (Holthuis, 1890) in southeast Queensland. *Invertebrate Reproduction and Development*, v. 26, n. 3, p. 205-212, 1994.
- CHARNIAUX-COTTON, H. Découverte chez un crustacé amphipode (*Orchestia gamarella*) d'une glande endocrine responsable de la différenciation des caractères sexuels primaires et secondaires mâles. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, v. 239, p. 780-782, 1954.
- CHOW, S.; OGASAWARA, Y.; TAKI, Y. Male reproductive system and fertilization of the palaemonid shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, v. 48, p. 177-183, 1982.
- CHOW, S.; TAKI, Y.; OGASAWARA, Y. Homologous functional structure and origin of the spermatophores in six palaemonid shrimps (Decapoda, Caridea). *Crustaceana*, v. 57, n. 3, p. 247-252, 1989.
- DAMRONGPHOL, P.; EANGCHUAN, N.; POOLSANGUAN, B. Spawning cycle and oocyte maturation in laboratory-maintained giant freshwater prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). *Aquaculture*, v. 95, p. 347-357, 1991.
- FERREIRA, R. L. Coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e da energia de alimentos para *Macrobrachium rosenbergii*. 2019, 36 f. Dissertação de Mestrado em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável do Setor Palotina, da Universidade Federal do Paraná
- FRANKLIN, M. S. Tecnologia de bioflocos no cultivo e pós-cultivo do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii*. 2019, 62 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, Recife, BR-PE.
- GRIFFEN, B. D. The timing of energy allocation to reproduction in an important group of marine consumers. *PLoS ONE*, v. 13, n. 6, Article e0199043, 2018.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. *Técnicas Básicas de Citologia e Histologia*. 1. ed. São Paulo: Santos, 1983.

LAWRENCE, A.; GREEN, S.; WANG, T.; BACHVAROFF, T.; CHUNG, J. S. Seasonal changes in the expression of insulin-like androgenic hormone (IAG) in the androgenic gland of the Jonah crab, *Cancer borealis*. PLoS One. 2022 Feb 3;17(2):e0261206. doi: 10.1371/journal.pone.0261206. PMID: 35113906; PMCID: PMC8812979.

MACHADO, M.; SALT, F. C.; BERTINI, G.; ZARA, F. J.; NEGREIROS-FRANSOZO, M. Is *Potimirim potimirim* (Crustacea, Decapoda, Atyidae) a protandric hermaphrodite species? Behavioral and morphological aspects of the reproductive system. *Arthropod Structure & Development*, v. 63, Article 101060, 2021.

MALECHA, S. R. et al. Sex-ratios and sex-determination in progeny from crosses of surgically sex-reversed freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, v. 105, p. 201-218, 1992.

MALECHA, S. The case for all-female freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man), culture. *Aquaculture Research*, v. 43, p. 1038-1048, 2012.

MANOR, R. et al. Insulin and gender: an insulin-like gene expressed exclusively in the androgenic gland of the male crayfish. *General and Comparative Endocrinology*, v. 150, p. 326-336, 2007.

MEERATANA, P.; SOBHON, P. Classification of differentiating oocytes during ovarian cycle in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* de Man. *Aquaculture*, v. 270, p. 249-258, 2007.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C. Práticas de biologia celular. São Paulo: Edgard Blücher/Funcamp, v. 57, p. 58, 1980.

MOLCHO, J. et al. Three generations of prawns without the Z chromosome: viable WW *Macrobrachium rosenbergii* all-female populations. *Aquaculture*, v. 515, p. 201, 2020.

MOSS, D. R.; MOSS, S. M. Effects of gender and size on food acquisition in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of World Aquaculture Society*, v. 37, p. 161-167, 2006.

NAGAMINE, C.; KNIGHT, A. W.; AGGENTI, A.; PAXMAN, G. Masculinization of female *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *General and Comparative Endocrinology*, v. 41, p. 442-457, 1980a.

NAGAMINE, C.; KNIGHT, A. W.; MAGGENTI, A.; PAXMAN, G. Effects of androgenic gland ablation on male primary and secondary sexual characteristics in the Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *General and Comparative Endocrinology*, v. 41, p. 423-441, 1980b.

NOGUEIRA, C. S.; ANTUNES, M.; ZARA, F. J.; COSTA, R. C. Male reproductive system of the freshwater prawn *Macrobrachium brasiliense* (Decapoda: Palaemonidae): Notes on spermatophore formation and sperm count. *Tissue and Cell*, v. 81, Article 102008, 2023.

O'DONOVAN, P.; ABRAHAM, M.; COHEN, D. The ovarian cycle during the intermoult in ovigerous *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, v. 36, p. 347-358, 1984.

OKUMURA, T.; HARA, M. Androgenic gland cell structure and spermatogenesis during the molt cycle and correlation to morphotypic differentiation in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Zoological Science*, v. 21, p. 621-628, 2004.

PASCHOAL, L. R. P.; ZARA, F. J. Is there a trade-off between sperm production and sexual weaponry in the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862)? *Zoology*, v. 153, p. 126029, 2022.

PASCHOAL, L. R. P.; ZARA, F. J. Size at onset of sexual maturity in *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) phenotypes: an integrative approach. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 92, n. 2, artigo e20180560, 2020.

PASCHOAL, L. R. P.; ZARA, F. J. Sperm count of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) populations with distinct life histories, with introduction of a simple counting method. *Aquaculture*, v. 491, p. 368-374, 2018.

PASCHOAL, L. R. P.; ZARA, F. J. The androgenic gland in male morphotypes of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862). *General and Comparative Endocrinology*, v. 275, p. 6-14, 2019.

PEARSE, A. G. Histoquímica. J. & A. Livingstone, 1960.

RA'ANAN, Z.; COHEN, D. The ontogeny of social structure in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. In: WENNER, A.; SCHRAM, F. R. (Eds.). *Crustacean Issues 2: Crustacean Growth*. Rotterdam: A. A. Balkema Publishers, 1985. p. 277-314.

SAGI, A.; COHEN, D.; MILNER, Y. Effect of androgenic gland ablation on morphotypic differentiation and sexual characteristics of male freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. *General and Comparative Endocrinology*, v. 77, p. 15-22, 1990.

SANDFER, P. A.; LYNN, J. W. Artificial insemination of caridean shrimp. In: CLARK JR., W. H.; ADAMS, H. S. (Eds.). *Recent Advances in Invertebrate Reproduction*. Amsterdam: Elsevier, 1980. p. 271-288.

SANTOS, I. T. F. Avaliação da atividade de enzimas digestivas em hepatopâncreas de juvenis de camarão de água doce (*Macrobrachium rosenbergii*). 2017. 53 f. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Zootecnia no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Zootecnia.

Sheehy, M. R. J. "Crustacean Brain Lipofuscin: An Examination of the Morphological Pigment in the Fresh-Water Crayfish *Cherax Cuspidatus* (Parastacidae)." *Journal of Crustacean Biology*, vol. 9, no. 3, pp. 387–91, 1989.

TAN, K.; LI, Y.; ZHOU, M.; WANG, W. siRNA knockdown of *MrlR* induces sex reversal in *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, v. 23, p. 0044-8486, 2020.

TINIKUL, Y. et al. Comparative neuroanatomical distribution and expression levels of neuropeptide F in the central nervous system of the female freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, during the ovarian cycle. *Journal of Comparative Neurology*, v. 530, p. 729-755, 2022.

TINIKUL, Y. et al. The effects of short neuropeptide F on ovarian maturation and spawning in female giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, and associated regulatory mechanisms. *Aquaculture*, v. 569, Article 739361, 2023.

TOMAS, A. L.; BENTO, M. A. G.; MUTTI, L. D.; ZARA, F. J.; LÓPEZ GRECO, L. S. New insights in the male anatomy, spermatophore formation, and sperm structure in Atyidae: The red cherry shrimp *Neocaridina davidi*. *Invertebrate Biology*, v. 138, n. 1, p. 17-28, 2019.

VENTURA, E.; WINICK-SILVA, A.; SHINOZAKI-MENDES, R. A. Ovarian development and spawning of *Macrobrachium amazonicum* (Crustacea, Decapoda). *Iheringia, Série Zoologia*, v. 109, 2019.

VENTURA, T. et al. Isolation and characterization of a female-specific DNA marker in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Heredity*, v. 107, p. 456-461, 2011.

VENTURA, T. et al. Timing sexual differentiation: full functional sex reversal achieved through silencing of a single insulin-like gene in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biology of Reproduction*, v. 86, p. 1-6, 2012.

VETKAMA, W. et al. Differential expression of neuropeptide F in the digestive organs of female freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, during the ovarian cycle. *Cell Tissue Research*, v. 397, p. 13-36, 2024.

VETKAMA, W. et al. Morphological and histochemical characteristics of the foregut, midgut, and hindgut, and their alterations during ovarian development in female freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Cell Tissue Research*, v. 397, p. 13-36, 2025.

XU, H. J. et al. Full functional sex reversal achieved through silencing of *MroDmrt11E* gene in *Macrobrachium rosenbergii*: production of all-male monosex freshwater prawn. *Frontiers in Endocrinology*, v. 12, p. 772498, 2022.