

unesp 

CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Criopreservação Embrionária
de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836)
Submetidos a Eletroporação e ao Ultrassom.

Raphael da Silva Costa

DOUTORADO

PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL

Biologia
Estrutural



Raphael da Silva Costa.

Criopreservação Embrionária de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836)
Submetidos a Eletroporação e ao Ultrassom.

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
para obtenção do título de Doutor em Biologia
Animal, na área de Biologia Estrutural, junto ao
programa de Pós-Graduação em Biologia
Animal.

Financiadora: FAPESP – Proc..2013/02588-5

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Ninhaus Silveira

São José do Rio Preto

2017

Costa, Raphael da Silva.

Criopreservação embrionária de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) submetidos a eletroporação e ao ultrassom / Raphael da Silva Costa. -- São José do Rio Preto, 2017

231 f. : il., tabs.

Orientador: Alexandre Ninhaus Silveira

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biotecnologia animal. 2. *Prochilodus lineatus*. 3. Peixe de água doce - Morfologia. 4. Peixe - Embrião - Criopreservação. 5. Peixe - Embrião – Efeito do stress. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 597

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Raphael da Silva Costa.

Criopreservação Embrionária de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836)

Submetidos a Eletroporação e ao Ultrassom.

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal, na área de Biologia Estrutural, junto ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.

Financiadora: FAPESP – Proc..2013/02588-5

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Alexandre Ninhaus Silveira.
UNESP – Campus de Ilha Solteira- SP.
Orientador.

Prof. Dr. Leandro Cesar de Godoy.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – RS.

Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton.
Universidade de São Paulo – SP.

Dr. George Shigueki Yasui.
UNESP – Bauru / CEPTA / ICMBio, Pirassununga.

Profa. Dra. Tais da Silva Lopes.
Instituto de Pesca – SP.

São José do Rio Preto- SP

28 de fevereiro de 2017

DEDICO

Ao meu pai Carlos Roberto Costa e minha mãe Elidia Maria da S. Costa, que me educaram e me possibilitaram mais essa conquista, exemplos de vida fundamentais para a minha vida pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a espiritualidade.

Ao meu pai Carlos Roberto Costa, que pelo exemplo e amor forjou meu caráter e cujas lembranças estão sempre em minha memória.

A minha mãe Elidia Maria da Silva Costa, pelo carinho, dedicação e amor, que sempre me apoiou e me amparou quando se fazia necessário, nunca deixando desistir perante as reais dificuldades enfrentadas em minha jornada.

A minha esposa amada e companheira Anay Gamero Costa, que sempre me acompanhou com todo amor e paciência, mesmo nas horas da ausência e dificuldades. Obrigado por me ajudar a encontrar os caminhos nas horas de escuridão.

Obrigado aos meus filhos Pedro Gamero R. Marinho e Vitor Gamero R. Marinho, por tornarem minha vida muito mais leve e agradável. Obrigado pelas danças, piadas, paciência e generosidade.

Agradeço a minha filha Luiza Gamero Costa por me permitir encontrar o sentido de minha existência.

Ao meu irmão Carlos Leandro da S. Costa por todos os esforços e abdições em sua vida para minha formação e a Tatiane Dinah Parpinelli Costa e a Carolina Parpinelli Costa por todo carinho, preocupações e apoio.

A minha tia Luzia dos Santos Gomes, que me acolheu como um filho, nos anos mais difíceis.

Agradeço imensamente a Mário Gonçalves Gamero, a Neiva Raggi Gonçalves Gamero, a Debora N. R. G. Gamero e ao Rogério Barbosa. Família amorosa e honrada que me acolheram como filho, auxiliando confortando e confiando.

Ao meu orientador Alexandre Ninhaus Silveira por todo conhecimento, amizade, compressão e paciência ao longo de minha formação. Eternamente serei grato também, pelos esforços realizados para formação de minha filha. Agradeço à Professora Dra. Rosicleire Verissimo Silveira, por todo conhecimento transmitido ao longo desta jornada, e por ter me aceitado como membro de seu grupo de pesquisa.

Agradeço ao Laboratório de ictiologia Neotropical (LINEo), pelos 11 anos de trabalhos, aprendizagem, divergências, viagens, festas, e muito crescimento tanto profissional quanto

pessoal. Agradeço aos orientados, que junto aos pesquisadores responsáveis, iniciaram os trabalhos e me auxiliaram no início de minha caminhada (Vanessa, que me ensinou a dureza da microtomia em parafina; a Helen Buzollo, quem me auxiliou nos primeiros artigos; agradeço ao Hugo, pelas infindáveis conversas; ao Felipe P de Lima “Limão”, pela visão otimista do mundo, e que muito me fez bem; ao Diogo “Pança”; a Isângela Rodrigues, pelas risadas, auxílios e grande aprendizado; a Renata Chedid e Ricardo Mori, pela parceria nesta nova etapa da formação; ao Diógenes H. de S. Silva, parceiro de coletas, trabalhos e festas por longos anos, e que felizmente, novamente me proporciona grandiosos conhecimentos; a Giovana S. Branco, amiga focada, trabalhadora, competente e muito verdadeira; a Laiza Silva, pela amizade; a Pricila Vianna; a Jumma Miranda e Douglas Ribeiro, casal de biólogos de grande potencial) e aqueles que, hoje compõem o novo Lineo, me permitindo crescer cada vez mais (Cristiane Bashiyo, parceira de inúmeras noites mal dormidas, infindáveis discussões e grande aprendizagem; a Amanda Pereira, amiga de inúmeras viagens e risadas, mas também muitas lágrimas e auxílios; a Patrícia Postingel, pelas risadas; A Elis Marina, por sua generosidade; ao Renan Leão, por suas opiniões inflamadas e grande coração; ao parceiro Fabricio Marçal, “que é só falar (...) não tem tempo ruim. Bora, vamos trabalhar! ”; ao Caio Capuzzo, homem/menino de grande generosidade com um brilhante caminho a frente; a Silvia Adriana, novo anjo da guarda do laboratório que veio facilitar a vida de todos; a Naiara Mendes Ross, que não tem ideia do quanto me ensinou; e por fim minha mais recente companheira Geovanna Coelho, que competência e honestidade esbanja), serei eternamente grato a todos!

Agradeço a parceira de trabalho Prof(a). Dr(a). Cristiéle da Silva Ribeiro, que permitiu realizar parte desse trabalho, e mais do que isso como uma amiga sempre esteve disponível para auxiliar e a me escutar, facilitando e muito minha jornada.

A Professora Dra. Renata Guimarães Moreira por abrir as portas do LAMEROA, para que as análises lipídicas fossem realizadas e por seu apoio nas avaliações dos resultados. Seus conhecimentos foram fundamentais ao nosso trabalho.

Agradeço ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais - CEPTA/ICMBIO por todo apoio no decorrer dos experimentos, em especial ao Dr. José Augusto Senhorini pela amizade e grande conhecimento transmitido. Agradeço também aos funcionários Luís Alberto Gaspar “Gordo”, Noel Donizetti Martins, Dalton Donizetti Machado, Arlindo Donizetti Lançoni, ao prestativo “Tim”, ao Dr. Leonardo Calado, Dra Maria Rita de C. Barreto Netto, Osmar Ângelo Cantelmo, Dr. Paulo Ceccarelli e Rita Alcântara, pois sem a ajuda

e experiência de vocês, seria uma missão impossível realizar este projeto, muito obrigado! Agradeço aos Pesquisadores do laboratório de biotecnologia, em especial ao Dr. George Shigueki Yasui. Agradeço também a Nilva Solange e Claudine Martins, que tornou nossa estadia mais agradável e nosso sono muito mais suportável. A todos do CEPTA agradeço de coração. Muito obrigado!

A todos os professores doutores do programa de pós-graduação em Biologia Animal pelo crescimento intelectual fornecido e pelas críticas ao projeto de pesquisa, que tanto me auxiliaram, principalmente a Professora Dra. Eliane Gonçalves de Oliveira.

Agradeço a empresa Guabi pelo fornecimento da ração de alta qualidade para a nutrição dos reprodutores.

Agradeço aos membros da banca Prof. Dr. Leandro Cesar de Godoy, Prof(a). Dr(a). Renata Guimarães Moreira Whitton, Dr. George Shigueki Yasui, Prof(a). Dr(a). Tais da Silva Lopes, Prof(a). Dr(a). José Augusto Senhorini, Prof(a). Dr(a). Eduardo Antônio Sanches e Prof(a). Dr(a). Cristiéle da Silva Ribeiro, que aceitaram avaliar meu trabalho e contribuir com seus anos de conhecimento adquiridos. Me sinto honrado por terem composto a comissão avaliadora de meu trabalho de doutorado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo consentimento da bolsa de doutorado (processo 2013/02588-5) e pelo financiamento dos experimentos.

"Coisa errada, não é uma coisa certa! "

Luiza Gamero Costa, 3 anos.

RESUMO

Na presente Tese, estudou-se novos protocolos de vitrificação para embriões de *Prochilodus lineatus*, empregando a sonoforese (ultrassom), o campo elétrico polarizado e a incorporação ácidos graxos essenciais as membranas embrionárias, buscando aumentar a permeabilidade embrionária e sua resistência mecânica. Assim, os resultados deste estudo estão aqui apresentados e organizados em oito capítulos: **Capítulo 1**, avaliou-se a sensibilidade embrionária a seis crioprotetores permeáveis (dimetilsulfóxido-Me₂SO₄, dimetilacetamida-DMA, dimetilformamida-DMF, metanol-MET, glicerol-GLY e 1,2-Propanediol-PROP) nas concentrações de 1 a 6M; e a dois crioprotetores não permeáveis (sacarose-SUC e a glicose-GLU), nas concentrações de 0,1 a 1M; definindo o uso isolado do Prop 6M como melhor opção, por permitir a formação de um sólido vítreo e baixa toxidez. No **Capítulo 2**, avaliou-se o efeito dos crioprotetores sobre o desenvolvimento embrionário de *P. lineatus*, padronizando cinco classes de anomalias morfológicas, baseando-se na distribuição gaussiana da morfometria de vinte embriões normais. Não foi possível encontrar especificidade entre as classes de anomalias e os crioprotetores. Esse ciclo de trabalho foi encerrado com **Capítulo 3**, que objetivou promover a vitrificação embrionária utilizando a solução de Prop-6M. Os embriões foram vitrificados de forma efetiva, contudo não houve sobrevivência embrionária. Assim, um novo ciclo na busca para o aumento da permeabilidade embrionária se iniciou com o **Capítulo 4**, que avaliou os efeitos do campo pulsado de ultrassom (1Mhz), sobre desenvolvimento embrionário de *P. lineatus*, identificando uma densidade energética máxima suportada. Definindo que a utilização dos campos ultrassônicos (1Mhz) é viável utilizando pulsos de 16Hz com uma densidade energética total até 1,12W/cm². No **Capítulo 5**, avaliou-se os efeitos do campo elétrico polarizado, sobre desenvolvimento embrionário, identificando uma densidade energética máxima suportada. Os embriões se mostraram sensíveis apresentando baixa sobrevivência. Como forma de avaliar os resultados obtidos nos capítulos anteriores, o **Capítulo 6** promoveu-se a vitrificação utilizando a solução de Prop 6M (Prop) associado ao ultrassom (1,2 Joule) e campo elétrico polarizado (0,4 e 1,7 Joule). Concluindo novamente que o processo de vitrificação ocorre de forma eficaz, contudo os embriões não resistem ao estresse das metodologias de vitrificação e aquecimento. Desta forma, o **Capítulo 7** nos ofereceu uma nova diretriz, incorporando ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LC-PUFA) nas membranas embrionárias, com o objetivo de aumentar a permeabilidade e a resistência aos campos elétricos. Comprovando ser possível alterar o perfil lipídico embrionário e sua

consequente plasticidade, tomando-o mais sensíveis aos crioprotetores e mais resistentes ao campo elétrico polarizado. Características colocadas em teste no **Capítulo 8**, que buscou vitrificar e aquecer embriões, com perfil lipídico manipulado e expostos ao campo elétrico polarizado. Não houve sobrevivência embrionária, contudo os danos promovidos pelo processo criogênico foi reduzido consideravelmente, permitindo após o aquecimento, obter embriões estruturados morfológicamente, semelhantes ao controle. Por fim, a recristalização tornou-se um dos principais obstáculos criogênicos; e também, esses resultados auxiliam a criopreservação embrionária, descrevendo uma solução crioprotetora de baixa toxidez e capacidade vítrea, novas abordagens para o aumento de sua permeabilidade e uma metodologia para aumentar a resistência mecânica dos embriões.

Palavras-chave: Biotecnologia, Criopreservação, Injúria, Morfologia, Toxicidade.

ABSTRACT

In the present thesis, new protocols of vitrification for embryos of Prochilodus lineatus were studied, using sonophoresis (ultrasound), polarized electric field and the incorporation of polyunsaturated fatty acids into the embryonic membranes, aiming to increase the embryonic permeability and its mechanical resistance. Thus, the results of this study are presented and organized in eight chapters: Chapter 1, the embryonic sensitivity to six internal cryoprotectants was evaluated (dimethylsulfoxide-Me₂SO₄, dimethylacetamide-DMA, dimethylformamide-DMF, methanol-MET, glycerol-GLY and 1,2-Propanediol-PROP) at concentrations of 1 to 6M; and to two external cryoprotectants (sucrose-SUC and glucose-GLU) at concentrations of 0.1 to 1M; It was defined that the isolated use of Prop 6M as the best option, since it allows the formation of a vitreous solid with low toxicity. In Chapter 2, the effect of the cryoprotectants on the embryonic development of P. lineatus was evaluated, standardizing five classes of morphological anomalies, based on the Gaussian distribution of the morphometry of twenty normal larvae. It was not possible to find specificity between the classes of anomalies and the cryoprotectants. This work cycle was concluded with Chapter 3, which aimed to promote embryonic vitrification using the Prop-6M solution. The embryos were vitrified effectively, however there was no embryonic survival. Thus, a new cycle in search for increased embryo permeability started with Chapter 4, which evaluated the effects of pulsed ultrasound field (1MHz) on embryonic development of P. lineatus, supported by identifying a maximum energy density. Defining that the use of the ultrasonic fields (1Mhz) is feasible using pulses of 16Hz with a total energy density up to 1.12W/cm². In Chapter 5, were evaluated the effects of the polarized electric field on embryonic development, identifying a maximum energy density supported. The embryos showed low survival, as a result of high sensitivity. As a way of evaluating the results obtained in the previous chapters, Chapter 6 promoted vitrification using the Prop 6M (Prop) solution associated with ultrasound (1.2 Joule) and polarized electric field (0.4 and 1.7 Joule). Concluding, again the results showed that the vitrification process occurs effectively, however, the embryos do not resist to the stress of the vitrification and heating methodologies. In this way, Chapter 7 offered us a new guideline, incorporating long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) in the embryonic membranes, with the objective of increasing permeability and resistance to electric fields. It was verified that it is possible to alter the phospholipid profile of the embryonic membranes and their plasticity, making the embryo more sensitive to cryoprotectants and more resistant to the polarized electric field.

Characteristics tested in Chapter 8, which sought to vitrify and heat embryos, with lipid profile manipulated and exposed to polarized electric field. There was no embryonic survival, however, the damage promoted by the cryogenic process was reduced considerably, allowing after heating, to obtain morphologically structured embryos, similar to the control. Finally, recrystallization has become one of the main cryogenic obstacles; and also, these results support embryonic cryopreservation, describing a cryoprotectant solution with low toxicity and vitreous capacity, new approaches to increase its permeability and a methodology to increase the mechanical resistance of the embryos.

Keywords: Biotechnology, Cryopreservation, Injury, Morphology, Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Sensibilidade embrionária aos crioprotetores permeáveis.....	47
Figura 1.2 - Sensibilidade embrionária aos crioprotetores não permeáveis.....	49
Figura 1.3 - Correlação de “Spearman” Concentração dos crioprotetores permeáveis X Sobrevivência.	50
Figura 1.4 – Capacidade vítrea e descongelamento das soluções crioprotetoras.	51
Figura 1.5 - Incorporação do crioprotetor.	53
Figura 1.6 - Variação volumétrica embrionária.	54
Figura 2.2 - Curva padrão da distribuição normal.....	69
Figura 2.3 - Distribuição normal dos caracteres morfológicos.	73
Figura 2.5 - Taxa de anormalidade embrionária relativa de <i>Prochilodus lineatus</i> , após a exposição aos crioprotetores não permeáveis.	77
Figura 2.6 - Categorização das Injúrias por solução crioprotetora.....	79
Figura 2.7 - Análise morfológica de <i>Prochilodus lineatus</i> após os tratamentos crioprotetores.	83
Figura 2.8 - Análise morfológica e histológica de embriões do corpo curvado e massa de celular anômala.	85
Figura 2.9 - Análise morfológica e histológica do rompimento da vesícula vitelina.....	87
Figura 2.10 - Análise morfológica e histológica de embriões sem forma.....	89
Figura 3.1 - Embryo’s cryotube.....	105
Figura 3.2 - Embrião de <i>Prochilodus lineatus</i> vitrificado e aquecidos.	109
Figura 3.3 - Efeitos do processo de vitrificação	111
Figura 4.1 - Campo de ondas mecânicas criado pelo “Sonopulse II: Combined Therapy”..	125
Figura 4.2 - Sobrevivência relativa dos embriões de <i>Prochilodus lineatus</i> após exposição aos campos de ultrassom.	128
Figura 4.3 - Alterações morfológicas após tratamentos de ultrassom.....	131
Figura 4.4 - Proporção das categorias de lesões.....	133
Figura 4.5 - Injúrias 12 horas após os tratamentos de ultrassom.....	135
Figura 5.1 - Câmara elétrica.	150
Figura 5.2 - Parâmetros do campo elétrico.....	151
Figura 5.3 - Efeito do campo elétrico sobre a morfologia embrionária.	153

Figura 5.4 - Sobrevivência embrionária de <i>Prochilodus lineatus</i> doze horas após a exposição ao campo elétrico.....	155
Figura 5.5 - Correlação de Spearman entre os níveis de energia e as taxas de normalidade e anormalidade.	156
Figura 5.6 - Análise morfológica de <i>Prochilodus lineatus</i> controle.....	157
Figura 5.7 - Análise morfológica de <i>Prochilodus lineatus</i> após os tratamentos com campos elétricos.....	159
Figura 5.9 - Análise histológica de embriões de <i>Prochilodus lineatus</i> após os tratamentos com campos elétricos.	163
Figura 6.1 - Racristalização na solução de 1,2-propanodiol [6M].....	181
Figura 6.2 - Efeitos da vitrificação e descongelamento sobre os embriões de <i>Prochilodus lineatus</i>	183
Figura 6.3 - Vitrificação e descongelamento de embriões de <i>Prochilodus lineatus</i> após os tratamentos de ultrassom e campo elétrico polarizado.....	185
Figure 7.1 - Electric field chamber.	201
Figure 7.2 - Electric field parameters.....	201
Figure 7.3 – Survival of the embryos of <i>Prochilodus lineatus</i> after their exposure to two solutions of 1,2-Propanediol.	205
Figure 7.4 - Survival of the embryos of <i>Prochilodus lineatus</i> after their exposure to the polarized electric field.....	206
Figura 8.1 - Vitrificação e aquecimento embrionário de <i>Prochilodus lineatus</i>	221
Figura 8.2 - Injúria após vitrificação e aquecimento.	223

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Classes de injúria.....	71
Tabela 4.1 - Parâmetros dos campos de Ultrassom	126
Tabela 4.2 - Energia transmitida pelo ultrassom	129
Tabela 5.1 - Parâmetros do campo elétrico polarizado.....	149
Table 7.1 - Fatty acids composition of total lipid and bromatological analysis from broodstock diets.....	199
Table 7.2 - Parameters of the polarized electric field.	200
Table 7.3 - Fatty acid profile (%) of neutral lipids from embryos of <i>Prochilodus lineatus</i> from different broodstock diets	203
Table 7.4 - Fatty acid profile (%) of polar lipids from embryos of <i>Prochilodus lineatus</i> from different broodstock diets	204

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

20S	Organogênese com 20 somitos
6S	Organogênese com 6 somitos
Ace	Acefalia
An	Núcleo anormal
As	Ausência de somitos
At	Ausência de cauda
Bd	Blastoderme dividida
Be	Curvatura
Bl	Comprimento corpóreo
Bla	Blastoderme
Blt	Blastômeros
Bm	Membrana basal
Br	Ruptura
Brm	Ruptura da Membrana
Cd	Morte celular
CDi	Célula em divisão
Co	Córnea
Cor	Córion
Cr	Trinca
Cso	Solução crioprotetora
Dab	Ângulo corpóreo dorsal
Dea	Distância entre vesículas óticas
Dey	Distância entre olhos
D	Duty factor (0.2 or 0.5)
E	Olho
Eb	Bolha epidérmica
Ec	Célula epidérmica
Ef	Nadadeira embrionária
Em	Embrião
En	Endoderme
Ep	Epitélio
Epi	Epiblasto
EVL	Camada de envelope
Ez	Zona de expansão (dilatação)
F	Nadadeira
Fb	Botão de fusão
Fi	Fissura
Fo	Dobras nas membranas
Fp	Frequência de pulso (Hz)
G	Gástrula
GLY	Glicerol
H	Cabeça
He	Coração
Hoy	Orifício no vitelo
Hy	Altura do vitelo
i	Corrente elétrica (mA)
Le	Lente
Lip	Último ponto de gelo
Lt	Comprimento da Cauda
Ly	Comprimento do vitelo
Ma	Mácula (Epitélio sensorial)

Me ₂ SO ₄	Dimetilsulfóxido
Mf	Micro dobras
Mfi	Microfissura
My	Miosepto
Nea	Distância entre o focinho e vesícula auditiva
Ney	Distância entre o focinho e olhos
Nf	Cristas neurais
Ng	Fenda neural
Nn	Núcleo normal
No	Notocorda
Nt	Tubo Neural
Nyo	Distância do focinho ao vitelo
O	Otólito
Ob	Bulbo olfatório
Oc	Ouvido interno com otólito
Op	Placode olfatório
Ot	Vesícula ótica
Pef	Campo elétrico polarizado
Ph	Faringe
Pot	Potência (Watts)
PROP	Propileno glicol
Re	Retina
Rf	Fibras musculares vermelhas
S	Somitos
Sab	Ângulo corpóreo lateral
Sca	Escape
Sf	Fibra muscular esquelética
Sfz	Sólido congelado
Snf	Formato de caracol
Sp	Espaço
SUC	Sacarose
T	Cauda
Te	Telencéfalo
Tf	Campo de tratamento (cm ²)
Th	Descongelamento
Ti	Tempo de tratamento (sec.)
Tr	Área do transdutor (cm ²)
U	Diferença de potencial/d.d.p (Voltz)
Vs	Sólido vítreo
Wf	Fibras brancas
Wt	Largura da Cauda
Wy	Largura da vesícula vitelínica
Y	Vitelo
Yd	Dilatação do vitelo
Ys	Saco vitelínico
YSL	Camada sincicial de vitelo

LISTA DE SIMBOLOS

+	Polo positivo
-	Polo Negativo
→	Direção campo elétrico polarizado.
ρ	Energy (J/cm ²);
▶	Mioblasto
*	Corpo vítreo
f(ϵ)	Energia acumulada (J/cm ²)
★	Retração vitelínica

SUMÁRIO

RESUMO.....	15
INTRODUÇÃO GERAL	29
CAPÍTULO 1 - DESCRIÇÃO DE SOLUÇÕES VÍTREAS BASEADO NA REDUÇÃO DOS FATORES DE RISCO.	37
RESUMO	40
INTRODUÇÃO	41
MATERIAL E MÉTODOS	42
RESULTADOS	45
DISCUSSÃO.....	54
AGRADECIMENTOS.....	58
BIBLIOGRAFIA.....	58
CAPÍTULO 2 - ANOMALIAS DESENVOLVIDAS PELOS EMBRIÕES DE <i>Prochilodus lineatus</i> APÓS EXPOSIÇÃO AOS CRIOPROTETORES.....	61
RESUMO	64
INTRODUÇÃO	65
MATERIAL E MÉTODOS	66
RESULTADOS.....	70
DISCUSSÃO.....	91
AGRADECIMENTOS.....	93
BIBLIOGRAFIA.....	93
CAPÍTULO 3 - VITRIFICAÇÃO EMBRIONÁRIA DE <i>Prochilodus lineatus</i> IMERSO EM SOLUÇÃO DE 1,2-PROPANEDIOL	97
RESUMO	100
INTRODUÇÃO	101
MATERIAL E MÉTODOS	102
RESULTADOS.....	107
DISCUSSÃO.....	113
AGRADECIMENTOS.....	115
BIBLIOGRAFIA.....	115
CAPÍTULO 4 - EFEITOS DO CAMPO ULTRA-SÔNICO SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE <i>Prochilodus lineatus</i>	119
RESUMO	122
INTRODUÇÃO	123
MATERIAL E MÉTODOS	124
RESULTADOS.....	127
DISCUSSÃO.....	130
AGRADECIMENTOS.....	138
BIBLIOGRAFIA.....	139
CAPÍTULO 5 - EFEITOS DO CAMPO ELÉTRICO POLARIZADO SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE <i>Prochilodus lineatus</i>	143
RESUMO	146
INTRODUÇÃO	147

MATERIAL E MÉTODOS	148
RESULTADOS	152
AGRADECIMENTOS	167
BIBLIOGRAFIA	167
CAPÍTULO 6 - VITRIFICAÇÃO EMBRIONÁRIA DE <i>Prochilodus lineatus</i> UTILIZANDO SOLUÇÃO DE 1,2-PROPANEDIOL (6M) ASSOCIADA AO CAMPO ULTRA-SÔNICO E AO CAMPO ELÉTRICO POLARIZADO.	171
RESUMO.....	174
INTRODUÇÃO.....	175
MATERIAL E MÉTODOS	177
RESULTADOS	178
DISCUSSÃO	187
AGRADECIMENTOS	189
BIBLIOGRAFIA	189
CAPÍTULO 7 - FATTY ACIDS INFLUENCE IN <i>Prochilodus lineatus</i> EMBRYO CRYOPRESERVATION PARAMETERS.	193
ABSTRACT	196
INTRODUCTION	197
MATERIAL AND METHODS.....	197
RESULTS	202
DISCUSSION.....	206
ACKNOWLEDGMENTS	208
REFERENCES	209
CAPÍTULO 8 - VITRIFICAÇÃO E AQUECIMENTO DE EMBRIÕES, COM PERFIL LIPÍDICO MANIPULADO, EXPOSTOS AO CAMPO ELÉTRICO POLARIZADO (+) E A SOLUÇÃO DE 1,2-PROPANEDIOL 5 M.	213
RESUMO.....	216
INTRODUÇÃO.....	217
MATERIAL E MÉTODOS.....	218
RESULTADOS	219
DISCUSSÃO	225
AGRADECIMENTOS	227
BIBLIOGRAFIA	227
CONCLUSÕES GERAIS.....	231

INTRODUÇÃO GERAL

O *Prochilodus lineatus*, popularmente conhecido como “Curimba” ou “Curimbatá”, é uma espécie que pertence à família Prochilodontidae, e apresenta ampla distribuição nas bacias do rio Paraná, Paraguai e Paraíba do Sul (América do Sul - Brasil) (REIS et al., 2003), possuindo grande importância ecológica e comercial. Devido sua reprodução exigir longos movimentos migratórios, em cativeiro só ocorre por meio de indução hormonal (GODINHO et al., 1984; TALMELLI et al., 1994), entre os meses de novembro e fevereiro (KUNKEL; FLORES, 1994). Possui rápido desenvolvimento embrionário (13 – 21 horas), ovos pelágicos não adesivos, grande espaço perivitelino e grande vitelo (NINHAUS-SILVEIRA, 2007; RIZZO et al., 2003), representando um ótimo modelo biológico para os estudos de criopreservação.

Há mais de seis décadas pesquisadores buscam uma metodologia eficaz para manter a viabilidade dos embriões de peixes e preservar “indefinidamente” a bagagem genética das espécies (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2007; ZHANG; RAWSON, 1995). Assim, essa ferramenta tornar-se-ia de grande valia tanto na formação de bancos genéticos, quanto na produção intensiva de organismos, em programas de seleção genética e no auxílio a preservação de espécies em risco de extinção (PULLIN, 1993; ROBLES et al., 2009). Contudo, as metodologias de criopreservação ainda esbarram em problemas fisiológicos ligados à perda da integridade funcional e estrutural das membranas, resultantes dos processos de exposição química, resfriamento, congelamento e descongelamento dos tecidos (BARTHELEMY et al., 1990; DE LEEUW et al., 1990; HOLT; HEAD; NORTH, 1992).

Giraud et al., (2000) demonstraram que a adaptabilidade das membranas às injúrias do processo de criopreservação em sêmen de humanos está diretamente relacionada à maior quantidade de ácidos graxos poliinsaturados nos espermatozoides. Desta forma, variações na temperatura alteram a estrutura das membranas celulares, podendo comprometer tanto as atividades enzimáticas associadas às membranas, quanto os processos de transporte. Esse conjunto de alterações nas propriedades químicas e físicas das membranas, resultam em mudanças na fluidez das mesmas (HAZEL, 1984), que em última instância, é o reflexo da natureza dinâmica das interações moleculares dentro da bicamada (SINGER; NICOLSON, 1972).

O grau de fluidez das membranas biológicas pode ser estimado por muitos métodos físicos, tais como: fluorescência, ressonância, espectroscopia e a quantificação dos componentes químicos, que compõe esta estrutura, tais como ácidos graxos dos fosfolipídios,

colesterol e proteínas. Ressaltando especificamente os ácidos graxos, sabe-se que, a extensão das insaturações destes componentes, contidos na estrutura da membrana, é o fator majoritário na manutenção do grau de fluidez (KATES et al., 1993). Segundo Torrenço e Brenner, (1976), a temperatura tem efeito comprovado no padrão de distribuição dos ácidos graxos e ação de enzimas que participam da manutenção da fluidez da membrana plasmática das células dos organismos.

Assim, o perfil dos ácidos graxos nos embriões pode influenciar os resultados da criopreservação. A composição dos ácidos graxos, presentes nos fosfolipídios, apresenta um papel fundamental na vitelogênese, servindo como substrato na síntese de vitelogenina, uma fosfoglicerolipoproteína que é formada no fígado em resposta à produção de estradiol (ROCHA; ROCHA, 2006). Neste contexto, observando-se que a vitelogênese é o processo pelo qual o citoplasma do oócito acumula substâncias de reservas para posterior utilização pelo embrião e a larva, quando as dietas maternas são deficientes, o desenvolvimento oocitário e o sucesso da progênie são prejudicados (IZQUIERDO et al., 2001). Na formação dos gametas masculinos das espécies de peixes, os ácidos graxos estão totalmente ligados à capacidade osmorregulatória dos espermatozoides, que podem ser hipo ou hipertônicos em relação a este meio, sendo estas características determinadas por um processo de desenvolvimento que ilustra a habilidade adaptativa de suas membranas e sua composição de fosfolipídios, que tem se desenvolvido no curso da evolução (DROKIN, 1993). A criopreservação de sêmen altera a dinâmica de interação de lipídeos e proteínas das membranas, e estas mudanças podem direta ou indiretamente alterar os eventos de fertilização, e ser parcialmente responsáveis pela diminuição da taxa reprodutiva (BUHR et al., 1994).

Os ácidos graxos estão presentes na composição vitelo, nas membranas dos espermatozoides e participam da formação estrutural das larvas (WILSON, 1995). Ácidos graxos altamente insaturados (HUFA) como o ácido docosahexaenóico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido araquidônico (AA) são estudados como imprescindíveis na formação de oócitos viáveis e simétricos (IZQUIERDO et al., 2001), e em altas quantidades, também são importantes no desenvolvimento embrionário e larval, no que diz respeito à proliferação celular e principalmente na formação dos tecidos nervosos (TOCHER et al., 1989). Bell e Tocher, (1995) demonstraram o papel essencial do DHA para a formação o cérebro, retina e outras partes do tecido neural em larvas. O estudo de criopreservação de embriões de teleósteos ainda é bastante elusivo, porém a importância do refinamento destas técnicas pode

ter uma profunda influência na aquicultura e conservação de espécies raras e ameaçadas de extinção.

As metodologias de crioconservação diferem basicamente por sua curva de resfriamento, pela reduzida temperatura de estoque e pela concentração da solução crioprotetora, tendo como objetivo comum, encontrar um equilíbrio entre as três variáveis citadas (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2002 e 2006). Por essa técnica, busca-se o congelamento profundo (à -196°C) e o estoque, por longos períodos, de células, tecidos, órgãos e embriões (SHAW et al., 2000); atualmente, baseado em diferentes curvas de resfriamento, descreve-se três possíveis modelos de protocolos; sendo: 1 - **Congelamento**: a temperatura é lentamente reduzida a uma taxa de resfriamento variando entre 0,5 e $1,2^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ (POLGE; WILLADSEN, 1978; ROBLES et al., 2003). 2 - **Congelamento Ultrarrápido**: dos gametas e embriões são resfriados por um acelerado procedimento de resfriamento ($-170^{\circ}\text{C}/\text{min}$) até atingir uma temperatura de -30°C sendo, posteriormente, mergulhados em nitrogênio líquido (NIEMANN, 1991). 3 - **Vitrificação**: a redução da temperatura ocorre bruscamente, sendo o material mergulhado diretamente no nitrogênio líquido, fazendo com que a parte sólida mantenha a estrutura molecular e a concentração iônica da parte líquida uma estrutura vítrea (HORTON; OTT, 1976; SHAW et al., 2000). Contudo, não só a etapa de congelamento é importante para preservar as características do material biológico, pois mesmo que o material seja devidamente preservado, ainda existe risco de sofrer danos ao longo do descongelamento pelo crescimento dos cristais de gelo, através de um processo denominado de recristalização (CAROLSFELD et al., 2003; ROBLES et al., 2003).

A nucleação e o crescimento dos cristais de gelo são umas das maiores dificuldades dos criobiologistas (GUAN et al., 2008; NINHAUS-SILVEIRA, 2007; ROBLES et al., 2009). Esses cristais se formam primeiramente no entorno da célula, em uma faixa de temperatura que varia de 0°C à -40°C , e quando tocam a membrana celular promove a formação intracelular, ocasionando a ruptura da tensão tecidual danificando o material congelado (HAGEDORN et al., 2004; RUBINSKY; PEGG, 1988). Além da nucleação dos cristais de gelo, as baixas temperaturas geram alterações no metabolismo celular devido à alta sensibilidade dos gametas e embriões ao frio (ESPINOZA et al., 2010; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006; ZHANG; RAWSON, 1995), exercendo grande influência no desenvolvimento ontogenético por degradar seu material genético e desnaturar importantes proteínas ao desenvolvimento embrionário, como a SBK1, gerando anormalidades nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (GWO et al., 1995; ZILLI; VILELLA, 2012).

Assim, os tratamentos sob baixas temperaturas requerem o uso de soluções crioprotetoras específicas, que devem penetrar na célula, inibir o desenvolvimento de cristais de gelo e proteger os componentes celulares dos danos gerados pelas baixas temperaturas (NEVES et al., 2014; ROBLES et al., 2003; ZILLI; VILELLA, 2012). Sendo necessário encontrar um adequado equilíbrio entre a água e os crioprotetores, o que é considerado uma das chaves para o processo de criopreservação. Essas substâncias permitem a redução ponto crioscópico da solução, que entram em um estado denominado de “supercooling”, ou seja, detentoras de temperaturas inferiores a faixa de nucleação do gelo, porém mantendo ainda seu estado líquido. Estes compostos são divididos em dois grupos: os que se difundem através das membranas celulares (dimetilsulfóxido, metanol, propileno glicol, glicerol, etc.), conhecidos como crioprotetores permeáveis, e os que não penetram na célula (sacarose, gema de ovo, etc.), chamados de crioprotetores não permeáveis, realizando a manutenção da pressão osmótica e estabilizando as membranas externas (STREIT-JR et al., 2007; ZHANG; RAWSON, 1995).

Contudo, os gametas e embriões de peixes são sensíveis a muitos dos agentes crioprotetores tradicionalmente utilizados, sendo esta toxicidade aumentada junto ao tempo de exposição, temperatura, concentração e o estágio de embrionário (SUZUKI et al., 1995; ZHANG; RAWSON, 1995). Podendo assim, sofrer danos graves como ativação genica, morte embrionária, problemas na formação do sistema nervoso, miogênese incompleta, etc. Desta forma, busca-se a redução da concentração dos crioprotetores e do tempo de exposição às soluções como forma de reduzir as injúrias oriundas dos protocolos de criopreservação.

A semipermeabilidade das membranas embrionárias em peixes, podem inibir a difusão das substâncias crioprotetoras, reduzindo a capacidade de desidratação celular, característica que facilitaria a nucleação de grandes cristais de gelo inviabilizando todos os protocolos até o momento descritos na literatura (HAGEDORN et al., 1997, 1998). Dados semelhantes em relação a permeabilidade das membranas são relatadas e publicações das áreas fisioterápica, médica (DENET et al., 2004) e engenharia genética (NIU; LIANG, 2008; TATSUKA et al., 1988), que também enfrentam a membrana plasmática como uma grande barreira à difusão de fármacos e fragmentos de DNA. Desta forma, a criopreservação exige novas abordagens que resultem em novas possibilidades para área, como o ultrassom, técnica que permite o aumento da permeabilidade dos tecidos biológicos por meio de ondas acústicas (BOUCAUD et al., 2002; JOHNS, 2002; WANG et al., 2008a) ou o uso do campo elétrico polarizado, que aumenta a permeabilidade das membranas biológicas devido sua interação com os lipídeos das membranas e com as cargas livres no interior das células e embriões (BENZ; BECKERS;

32

ZIMMERMANN, 1979; RAHMAN et al., 2013). Assim, objetivou-se avaliar e estabelecer novos protocolos de vitrificação para embriões de *Prochilodus lineatus*, utilizando as metodologias de sonoforese (ultrassom) e campo elétrico polarizado, além da incorporação de ácidos graxos essenciais as membranas embrionárias, que influenciam na permeabilidade e sua resistência mecânica.

Bibliografia

AGABA, M.K., TOCHER, D.R., ZHENG, X., DICKSON, C. A, DICK, J.R., TEALE, A.J. Cloning and functional characterisation of polyunsaturated fatty acid elongases of marine and freshwater teleost fish. **Comparative biochemistry and physiology B** v. 142, n. 3, p. 342–52, 2005.

BARTHELEMY, C., ROYERE, D., HAMMAHAH, S., LEBOS, C., THARANNE, M.J., LANSAC, J. Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation. **Archives of andrology** v. 25, n. 1, p. 29–40 , 1990.

BELL, M.V.; TOCHER, D.R. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in aquatic ecosystems: general pathways and new directions. In: ARTS, M.T.; BRET, M.T.; KAINZ, M.J. (Orgs.). **Lipids in aquatic ecosystems**. New York: Springer Science, 1995. p. 211–236.

BENZ, R; BECKERS, F; ZIMMERMANN, U. Reversible electrical breakdown of lipid bilayer membranes: a charge-pulse relaxation study. **The Journal of membrane biology** v. 48, n. 2, p. 181–204 , 1979.

BUHR, M.M.; CURTIS, E.F.; KAKUDA, S. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. **Cryobiology** v. 31, p. 224–238 , 1994.

BOUCAUD, A., GARRIGUE, M.A., MACHET, L., VAILLANT, L., PATAT, F., 2002. Effect of sonication parameters on transdermal delivery of insulin to hairless rats. *J. Control. Release* 81, 113–9.

CAROLSFELD, J., GODINHO, H.P., ZANIBONI FILHO, E., HARVEY, B.J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology** v. 63, n. 2, p. 472–489 , 2003.

CHANG, D.C.; REESE, T.S. *Changes by revealed rapid-freezing microscopy*, 1988

De LEEUW, F.E., CHEN, H.C., COLENBRANDER, B., VERKLEIJ, A J. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology** v. 27, n. 2, p. 171–83 , 1990.

DENET, A.-R., VANBEVER, R., PRÉAT, V. Skin electroporation for transdermal and topical delivery. **Advanced drug delivery reviews** v. 56, n. 5, p. 659–74 , 2004.

DROKIN, S.I. Phospholipid distribution and fatty acid composition of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in sperm of some freshwater and marine species of fish. **Aquatic Living Resource** v. 6, p. 49–56 , 1993.

EISMANN, D.; ALENCASTRO, D. Interação de campos elétricos de alta intensidade com membranas biológicas : eletroporação e eletrodeformação. **Revista virtual de química** v. 2, n. 4, p. 262–270 , 2010.

ESPINOZA, C., VALDIVIA, M., DUPRE, E. Morphological alterations in cryopreserved spermatozoa of scallop *Argopecten purpuratus*. **Latin American Journal of Aquatic Research** v. 38, n. 1, p. 121–128 , 2010.

FÁVARO, T. Lambari ganha mercado, na pesca e na mesa: de isca viva a petisco, peixe deixa de ser praga em tanques para se tornar fonte de renda. **Suplemento Agrícola do Estadão** 2002.

GARUTTII, V.; BRITSKI, H.A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia, Série Zoologia** v. 13, p. 65–88 , 2000.

GIRAUD, M.N., MOTTA, C., BOUCHER, D., GRIZARD, G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. **Human reproduction (Oxford, England)** v. 15, n. 10, p. 2160–4 , 2000.

GODINHO, H.M.; ROMAGOSA, E.; CESTAROLLI, M.A. Reprodução induzida de curimatá, *Prochilodus scrofa* Steind., 1881, sob condições de cultivo experimental. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** v. 8, n. 2, p. 113–119 , 1984.

GIRAUD, M.N., MOTTA, C., BOUCHER, D., GRIZARD, G. Cellular membrane potentials induced by alternating fields. **Biophysical Journal** v. 63, n. 6, p. 1632–1642 , 1992.

GUAN, M; RAWSON, D M; ZHANG, T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes using improved controlled slow cooling protocols. **Cryobiology** v. 56, n. 3, p. 204–8 , 2008.

GWO, J.C.; STRAW, K.; ARNOLD, C.R. Changes in mechanical tolerance and chilling sensitivity of red drum (*Sciaenopus ocellatus*) embryos during development. **Theriogenology** v. 43, p. 1155–1161 , 1995.

HAGEDORN, M., PETERSON, A, MAZUR, P., KLEINHANS, F.W. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option. **Cryobiology** v. 49, n. 2, p. 181–9 , 2004.

HAGEDORN, M., KLEINHANS, F.W., ARTEMOV, D., PILATUS, U., 1998. Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo. *Biol. Reprod.* 59, 1240–50.

HAGEDORN, M., KLEINHANS, F.W., WILDT, D.E., RALL, W.F., 1997. Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. *Cryobiology* 34, 251–63.
doi:10.1006/cryo.1997.2002.

HAMZA, N., MHETLI, M., KESTEMONT, P. Effects of weaning age and diets on ontogeny of digestive activities and structures of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. **Fish Physiology and Biochemistry** v. 33, n. 2, p. 121–133 , 2007.

HAZEL, J. R. Effects of temperature on the structure and metabolism of cell membranes in fish. **American Journal of Physiology** v. 246, p. R460–470 , 1984.

HOLT, W. V.; HEAD, M F; NORTH, R. D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. **Biology of reproduction** v. 46, n. 6, p. 1086–94 , 1992.

HORTON, H.F., OTT, A.G. Cryopreservation of Fish Spermatozoa and Ova. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada** v. 33, p. 995–1000 , 1976.

IZQUIERDO, M. S.; FERNÁNDEZ-PALACIOS, H.; TACON, A. G. J. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. **Aquaculture** v. 197, p. 25–42 , 2001.

JOHNS, L.D., 2002. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: The frequency resonance hypothesis. *J. Athl. Train.* 37, 293–299.

KATES, M.; MOLDOVEANU, N.; STEWART, L.C. On the revised structure of the major phospholipid. **Biochimica et biophysica acta** v. 1169, p. 46–53 , 1993.

KUNKEL, H. L.; FLORES, S. A. Reproducción de *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881) Osteichthyes , Prochilodontidae: Histología y escala de maduración de ovarios. **Boletim do Instituto de Pesca** v. 21, n. 83-94 , 1994.

- MCNIVEN, M. A.; GALLANT, R. K.; RICHARDSON, G. F. Fresh storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen using a non-aqueous medium. **Aquaculture** v. 109, p. 71–82, 1993.
- NEVES, P.R., RIBEIRO, R.P., STREIT, D.P., NATALI, M.R.M., FORNARI, D.C., SANTOS, A.I., GODOY, L.C. Injuries in pacu embryos (*Piaractus mesopotamicus*) after freezing and thawing. **Zygote** v. 22, n. 1, p. 25–31, 2014.
- NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology** v. 35, n. 1, p. 109–124, 1991.
- NINHAUS-SILVEIRA, A., SILVEIRA, R.V., SENHORINI, J.A., ALEXANDRE, J.S., CHAGURI, M.P. Fertilidade do sêmen de matrinxã (*Brycon amazonicus*) criopreservado em nitrogênio líquido. **Boletim técnico do CEPTA** v. 19, p. 1–8, 2006.
- NINHAUS-SILVEIRA, A. Preservação dos gametas de peixes e suas aplicações. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias** v. 20, n. 4, p. 516–517, 2007.
- NINHAUS-SILVEIRA, A. FORESTI, F.; TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G. VERISSIMO-SILVEIRA, R. Cryopreservation of rainbow trout semen: diluent, straw and the vapor column. **Boletim do Instituto de Pesca** v. 28, p. 135–139, 2002.
- NIU, Y., LIANG, S. Progress in gene transfer by germ cells in mammals. **Journal of genetics and genomics** v. 35, n. 12, p. 701–14, dez. 2008.
- POLGE, C.; WILLADSEN, S. M. Freezing, Eggs and of Farm Animals. **Cryobiology** v. 15, p. 370–373, 1978.
- PULLIN, R.S.V. Ex-Situ conservation of the germplasm of aquatic organisms. **Aquabyte section** v. 944, p. 15–17, 1993.
- RAHMAN, S.M., STRÜSSMANN, C. A, SUZUKI, T., WATANABE, M. Electroporation enhances permeation of cryoprotectant (dimethyl sulfoxide) into Japanese whiting (*Sillago japonica*) embryos. **Theriogenology** v. 79, n. 5, p. 853–8, 15 mar. 2013.
- REIS, R. E.; KULLANDERE, S. O.; FERRARIS JR, C. J. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p. 729.
- RIBEIRO, C.S. A influencia térmica na regulação da expressão gênica e sua ação na dinâmica das membranas celulares. **Revista da Biologia** v. 4, n. 1997, p. 6–9, 2010.
- RIZZO, E., GODINHO, H.P., SATO, Y. Short-term storage of oocytes from the neotropical teleost fish *Prochilodus marginatus*. **Theriogenology** v. 60, n. 6, p. 1059–1070, out. 2003.
- ROBLES, V., CABRITA, E., REAL, M., ÁLVAREZ, R., HERRÁEZ, M. Vitrification of turbot embryos: preliminary assays. **Cryobiology** v. 47, n. 1, p. 30–39, ago. 2003.
- ROBLES, V.; CABRITA, E.; ACKER, J. P. Embryo cryopreservation: what we know until now. In: CABRITA, E.; ROBBLES, V.; HERRÁEZ, P. (Orgs.). **Methods in Reproductive Aquaculture**. New York: Taylor & Francis Group, 2009. p. 265–294.
- ROCHA, M. J.; ROCHA, E. Morphofunctional aspects of reproduction from synchronous to asynchronous fishes—an overview. In: REINECKE, M.; ZACCONE, G.; KAPOOR, B. G (Orgs.). **Fish Endocrinology**. New Hampshire: Science Publishers, 2006. p. 571–624.
- RUBINSKY, B.; PEGG, D. E. A mathematical model for the freezing process in biological tissue. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain)** v. 234, n. 1276, p. 343–58, 23 ago. 1988.

SARGENT, J.R. Origins and functions of egg lipids: Nutritional implications. In: BROMAGE, N.R.; ROBERTS, R.J. (Orgs.). **Broodstock management and egg and larval quality**. Cambridge: Blackwell Science Ltd. University Press, 1995. p. 353–372.

SHAW, J.M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A.O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology** v. 53, p. 59–72, 2000.

SINGER, S.J.; NICOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science (New York, N.Y.)** v. 175, n. 4023, p. 720–31, 18 fev. 1972.

STREIT JÚNIOR, D.P., DIGMAYER, M., MORAES, G.V. DE, RIBEIRO, R.P., GALO, J.M., SIROL, R.N. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v. 42, n. 8, p. 1199–1202, 2007.

SUZUKI, T., KOMADA, H., TAKAI, R., ARII, K., KOZIMA, T.T. Relation between toxicity of crioprotectant DMSO and its concentration in several fish embryos. **Fisheries Science** v. 61, n. 2, p. 193–197, 1995.

TALMELLI, E.F.A., NARAHARA, M.Y., ROMAGOSA, E., VAZZOLER, A.E.A. Fases de degeneração ovocitária em curimatá *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881), mantido em confinamento. **Revista Unimar** v. 16, p. 83–96, 1994.

TATSUKA, M., ORITA, S., YAGI, T., KAKUNAGA, T. An improved method of electroporation for introducing biologically active foreign genes into cultured mammalian cells. **Experimental cell research** v. 178, n. 1, p. 154–62, set. 1988.

TOCHER, D.R.; CARR, J.; SARGENT, J.R. Polyunsaturated fatty acid metabolism in fish cells: differential metabolism of (n-3) and (n-6) series acids by cultured cells originating from a freshwater teleost fish and from a marine teleost fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A** v. 94, p. 367–374, 1989.

TORRENGO, M.P.; BRENNER, R.R. Influence of environmental temperature on the fatty acid desaturation and elongation activity of fish (*Pimelodus maculatus*) liver microsomes. **Biochimica et biophysica acta** v. 424, p. 36–44, 1976.

WANG, R.Y., GUAN, M., RAWSON, D.M., ZHANG, T., 2008. Ultrasound enhanced methanol penetration of zebrafish (*Danio rerio*) embryos measured by permittivity changes using impedance spectroscopy. *Eur. Biophys. J.* 37, 1039–1044. doi:10.1007/s00249-007-0229-0.

WALLACE R.A., SELMAN K. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. **J Electron Microscop Tech** 16: 175-201. 1990.

WESTERFIELD, M. **The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*)**. Institute of Neuro Science-University of Oregon, 1995.

WILSON, R.P. Lipid nutrition of finfish. In: LIM, C.E.; SESSA, D.J. (Orgs.). **Nutrition and Utilization Technology in Aquaculture**. Champaign: AOCS Press, 1995. p. 74–81.

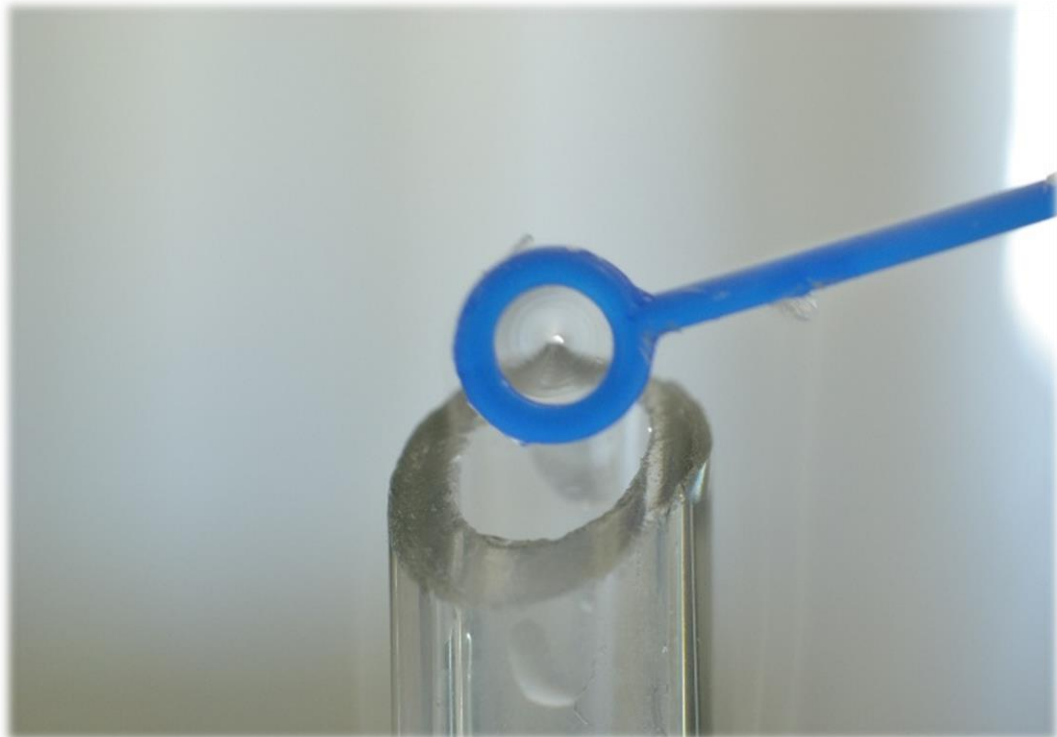
ZHANG, T.; RAWSON, D.M. Studies on Chilling sensitivity of Zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology** v. 32, p. 239–246, 1995.

ZILLI, L.; VILELLA, S. Effect of cryopreservation on bio-chemical parameters, DNA integrity, protein profile and phosphorylation state of proteins of seawater fish spermatozoa. **Cryobiology**. p.392-414, 2012

ZIMMERMANN, U., PILWAT, G., BECKERS, F., RIEMANN, F. Effects of External Electrical Fields on Cell Membranes. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics** v. 3, p. 58–83, 1976.

CAPÍTULO 1

Descrição de soluções vítreas baseado na redução dos fatores de risco.



Raphael da Silva Costa

Descrição de soluções vítreas baseado na redução dos fatores de risco.

Raphael da Silva Costa ^{a,c,*}, Fabrício Marçal Silva de Souza ^a, José Augusto Senhorini ^b, Douglas de Castro Ribeiro^c, Cristiane Bashiyo-Silva^a, Rosicleire Verissimo Silveira ^a, Alexandre Ninhaus-Silveira ^a.

^a Laboratório de Ictiologia Neotropical – LINEO, Depto de Biologia e Zootecnia, FEIS/UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Avenue Brasil, 56, 15085-000, Ilha Solteira, São Paulo, Brazil.
Phone: +55 018 37431285, Fax: +55 018 37422140

^b Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais at Instituto Chico Mendes da Conservação de Biodiversidade – CEPTA/ICMBio, Pirassununga, São Paulo, Brazil

^c Pós-Graduação em Biologia Animal, IBILCE/UNESP/Campus de São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

* Corresponding author. Tel: +551837434388.

E-mail address: costa_rs@yahoo.com.br

Resumo

A vitrificação é considerada uma das metodologias mais promissoras para criopreservação de embriões de peixes, apesar de necessitar de grandes concentrações de crioprotetores. Assim, o objetivo de nosso trabalho foi descrever uma solução crioprotetora de baixa toxicidade, que permitisse a formação de um sólido vítreo. Embriões de *Prochilodus lineatus* no estágio de gástrula foram submetidos às avaliações de sensibilidade de seis crioprotetores permeáveis (dimetilsulfóxido- Me_2SO_4 , dimetilacetamida-DMA, dimetilformamida-DMF, metanol-MET, glicerol-GLY e 1,2-Propanediol-PROP) nas concentrações de 1 a 6M; e a dois crioprotetores não permeáveis (sacarose-SUC e a glicose-GLU), nas concentrações de 0,1 a 1M, por um período de 20 minutos; quantificando também os efeitos do estresse gerado sobre os embriões em duas formas de exposição (direta e gradativa). A capacidade das soluções crioprotetoras trocarem calor com o meio e formarem um sólido vítreo, foi avaliada mergulhando 10 μl em nitrogênio líquido, classificando o sólido formado e contabilizando o tempo de descongelamento posterior. Por fim, quantificou-se, através do Motic Image Plus 2.0ml, o volume dos embriões expostos aos crioprotetores por vinte e cinco minutos. Na avaliação dos resultados, aplicou-se os testes de Bartlett e Shapiro-Wilk, Kruskal Wallis, Student's test e correlação de "Spearman", realizados por meio do Software "R Development Core Team (2010)". A DMA e DMF foram altamente tóxicas, enquanto o Me_2SO_4 , MET e GLI permitiram uma sobrevivência acima de 50% em concentrações iguais ou inferiores a 3M. Contudo, o PROP apresentou elevada taxa de sobrevivência em todas as concentrações avaliadas, e foi o único crioprotetor a permitir a formação de um sólido vítreo. A sobrevivência dos embriões expostos aos crioprotetores de forma gradativa aumentou cerca de 69% com relação à exposição direta. E por fim, observa-se que os embriões de *P. lineatus* sofrem alta variação do seu volume até o segundo minuto de exposição, apresentando seu menor volume em 30 segundos.

Palavras-chave: Toxicidade, crioprotetor, embriologia, gástrula, biotecnologia

Introdução

Os embriões de peixes são complexos sistemas biológicos formados por diferentes compartimentos, como um grande vitelo delimitado por um sincício celular (camada sincicial de vitelo), um compartimento celular (blastoderme ou embrião em desenvolvimento), sendo tudo rodeado por um espaço perivitelino delimitado pela membrana coriônica (JARAMILLO et al., 2012; NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006; ROBLES et al., 2009). Esses compartimentos formam grandes barreiras durante os processos de crioconservação, caracterizando uma baixa relação entre a área e o volume e diferentes taxas de osmolaridade que dificultam o efluxo e influxo da água e crioprotetores (HAGEDORN et al., 2004; HARVEY; KELLEY; ASHWOOD-SMITH, 1983; MULDREW; MCGANN, 1990; RAWSON et al., 2000; ROBLES et al., 2009).

A existência dessas barreiras biológicas inviabilizou, até o presente momento, a descrição de um protocolo reproduzível para criopreservação de embriões de peixes por dificultar o controle da nucleação e crescimento dos cristais de gelo (GWO; STRAWN; ARNOLD, 1995; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008; ROBLES et al., 2009). Esses cristais se formam primeiramente no entorno celular, em uma faixa de temperatura que varia de 0°C a -40°C, e ao tocarem a membrana embrionária promovem a formação de gelo intracelular, promovendo ruptura tecidual no material congelado (HAGEDORN et al., 2004; PEGG, 2010; RUBINSKY; PEGG, 1988).

Além da formação dos cristais de gelo, as baixas temperaturas geram alterações no metabolismo celular (DINNYÉS et al., 1998; ESPINOZA; VALDIVIA; DUPRE, 2010; NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; DE AZEVEDO, 2006; ZHANG; RAWSON, 1995), exercendo uma grande influência no desenvolvimento ontogenético por degradar material genético e desnaturar proteínas importantes ao desenvolvimento embrionário (GWO; STRAWN; ARNOLD, 1995; ZILLI; VILELLA, 2012). A sensibilidade ao frio é característica da espécie e do tipo celular, sendo comumente maior nos estágios iniciais de desenvolvimento e decrescendo ao longo do desenvolvimento (DINNYÉS et al., 1998; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008; ROBLES et al., 2003; ZHANG; RAWSON, 1995).

Assim, os tratamentos sob baixas temperaturas, necessitam do uso de soluções que promovam a proteção dos componentes celulares, reduzindo os efeitos gerados pelas baixas temperaturas (CABRITA et al., 2003; NEVES et al., 2012; ZILLI; VILELLA, 2012). Essas soluções, denominadas de crioprotetores, são divididos em dois grupos de acordo com sua

capacidade de difusão, sendo os que difundem através das membranas celulares (dimetilsulfóxido, metanol, propileno glicol, glicerol, etc.), conhecidos como crioprotetores permeáveis e os crioprotetores não permeáveis (sacarose, glicose, etc.), que não penetram a membrana plasmática (FORNARI et al., 2011; ZHANG; RAWSON, 1995).

Contudo, apesar de sua necessidade durante os processos de criopreservação, essas soluções podem apresentar elevada toxidez embrionária. Os embriões são sensíveis aos agentes crioprotetores tradicionalmente utilizados, sendo esta toxicidade relativa ao tempo de exposição, temperatura, concentração, propriedades químicas, fase de desenvolvimento e da espécie em estudo. Atualmente, os mais utilizados: o dimetilsulfóxido, o metanol, o glicerol, propileno glicol, sacarose e glicose (KIRICHEK et al., 2016; SUZUKI et al., 1995; ZHANG; RAWSON, 1995; ZILLI; VILELLA, 2012).

O *Prochilodus lineatus*, denominado de “Curimba” ou “Curimbatá” pertence à família Prochilodontidae e apresenta ampla distribuição nas bacias do rio Paraná, Paraguai e Paraíba do Sul (América do Sul - Brasil) (REIS; KULLANDER; FERRARIS-JR, 2003), possuindo grande importância ecológica e comercial. Para a reprodução necessita realizar movimentos migratórios, contudo pode ser facilmente reproduzido em cativeiro por meio de indução hormonal (NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; DE AZEVEDO, 2006; PAULA et al., 2014), semelhante ao *Brycon cephalus* (BASHIYO-SILVA et al., 2015). Apresenta rápido desenvolvimento embrionário (13 – 21 horas), ovos com grande espaço perivitelino, não adesivos, com um grande vitelo e pelágicos (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2007; RIZZO; GODINHO; SATO, 2003). A desova ocorre durante um período que se estende de novembro a fevereiro, sugerindo que a espécie apresenta desova do tipo total (KUNKEL; FLORES, 1994).

Assim, o objetivo de nosso trabalho foi descrever uma solução crioprotetora de baixa toxidez e que permitisse a formação de um sólido vítreo.

Material e métodos

Embriões

Utilizou-se embriões de *Prochilodus lineatus* obtidos através da reprodução de espécimes existentes no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais -

CEPTA/ICMBIO, Pirassununga/S.P. Induziu-se os reprodutores a reprodução ministrando aplicações intracelomática de extrato bruto de hipófise; sendo utilizado duas doses, com intervalo de 10 horas entre elas, para as fêmeas (0,5 e 5mg/Kg de peixe, respectivamente) e dose única aos machos (1mg/Kg). Os embriões foram mantidos em incubadoras verticais de 60 litros com fluxo contínuo de água a uma temperatura média de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e uma taxa de oxigênio de 5,2mg/L. Utilizou-se nos experimentos embriões com 3h de desenvolvimento, estágio de gástrula (NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006).

Sensibilidade aos Crioprotetores

Cada tratamento iniciou com a seleção e separação das amostragens embrionárias; sendo estas, depositas em incubadoras experimentais confeccionadas por nós com anéis de PVC, nas dimensões de 10cm de altura por 10cm de diâmetro, fechada em uma das extremidades através de uma tela de nylon, com espaçamento de 4 micras entre nós, e flutuadores de espuma, que proviam flutuabilidade e estabilidade das amostras. No decorrer dos experimentos, os embriões foram mantidos dentro das incubadoras experimentais, da seleção à coleta, pois assim reduzia-se o estresse mecânico do manejo e permitia o isolamento das amostragens nos tanques com fluxo contínuo de água.

Após separadas, as amostras sofriam a permeabilização da membrana coriônica por banho em solução de Pronase-E (0,2M por 10seg) (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008), seguida pela exposição, por um período de 20 minutos (SUZUKI et al., 1995) a seis soluções crioprotetoras permeáveis (dimetilsulfóxido- Me_2SO_4 , dimetilacetamida-DMA, dimetilformamida-DMF, metanol-MET, glicerol-GLY e 1,2-Propanediol-PROP) nas concentrações de 1M, 2M, 3M, 4M, 5M e 6M; e a dois crioprotetores não permeáveis (sacarose-SUC e a glicose-GLU), nas concentrações de 0,1, 0,25, 0,50, 0,75 e 1M. A toxicidade de cada crioprotetor foi avaliada individualmente, buscando o entendimento dos efeitos de cada dos químicos, em cada uma das possíveis concentrações, sobre o desenvolvimento embrionário de *P. lineatus*. Por fim, foram lavados em água corrente e acondicionados em tanques com fluxo contínuo de água, por um período de doze horas, sendo posteriormente fixados (15 horas após a fecundação) em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2%.

Teste de Vitrificação

Cada uma das soluções foi depositada em uma alça calibrada e estéril de 10 μ l, confeccionada em poliestireno de alto impacto, e mergulhada por 1 minuto em nitrogênio líquido, sendo verificado, fotografado e categorizado o seu sólido em forma vítrea (translúcido) ou congelada (branca). Posteriormente, cronometrou-se o descongelamento de cada sólido (a temperatura ambiente $28 \pm 1^\circ\text{C}$), adotando como tempo final o desaparecimento do último cristal de gelo visível (região branca).

Avaliou-se a capacidade de vitrificação das seguintes soluções: PROP[6M], Me₂SO₄ [2M], SAC[5M], PROP[6M] + Me₂SO₄ [2M] e PROP[6M]+ Me₂SO₄ [2M]+SAC[5M]. A seleção dos crioprotetores baseou-se no teste de “sensibilidade aos crioprotetores”.

Incorporação dos crioprotetores

Os embriões foram expostos a soluções de 1,2 Propanediol 4 molares (PROP-4M) de duas formas distintas: *1ª Avaliação* - Os embriões foram mergulhados diretamente na solução por um período de 20 minutos. *2ª Avaliação* - foram imersos em uma sequência de soluções com osmolaridade crescente [1M, 2M, 3M e 4M], sendo o período de cada etapa de 5 minutos, totalizando 20 minutos. Por fim, foram lavados em água corrente e acondicionados em tanques de fluxo contínuo por um período de doze horas, sendo posteriormente fixados em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2%. A baixa concentração de PROP mitigou o efeito tóxico do químico, demonstrando melhor os efeitos do estresse osmótico.

Avaliação da Permeabilidade – Variação do Volume.

Os embriões de *Prochilodus lineatus* foram separados em dez amostras, contendo cada uma delas, dez embriões. As alíquotas embrionárias foram submergidas em solução vitrificante de PROP-6M, sendo emergidas e coletadas uma amostra por vez, nos tempos de 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 e 25 minutos. A seleção do químico crioprotetor e sua concentração baseou-se nos resultados obtidos nos testes anteriores como elevada sobrevivência e alta concentração.

Todos os embriões foram semelhantemente orientados e fotomicrografados com uma câmera Moticam 2500 (5.0M Pixel USB2.0) sob estereomicroscopia de luz. Estimando-se por meio do programa Motic Image Plus 2.0ml o volume *embrionário relativo*.

Análise estatística

Todos os tratamentos foram realizados inteiramente ao acaso, sendo que os testes de “sensibilidade aos crioprotetores” e “incorporação dos crioprotetores” contaram com seis repetições contendo $119 \pm 9,7$ embriões por amostra enquanto as avaliações de “Solidificação das soluções” e “Avaliação de Permeabilidade” contaram com 10 repetições. Aplicou-se os testes de Bartlett e Shapiro-Wilk, para avaliar a homocedasticidade e normalidade, respectivamente; aplicando posteriormente Kruskal Wallis e Student’s test. Após a avaliação da normalidade nos resíduos do modelo, aplicou-se também os testes de correlação de “Spearman”. Todos os testes foram realizados através do Software “R Development Core Team (2010)”.

Resultados

Sensibilidade aos Crioprotetores.

Os tratamentos de toxicidade não apresentaram homogeneidade ($P < 0,05$) nem homocedasticidade ($P < 0,05$). Assim utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis demonstrando a existência de diferenças entre as taxas de sobrevivências promovidas pelo uso dos crioprotetores permeáveis, não permeáveis e suas concentrações ($P < 0.001$). Ao avaliar os resíduos, não se obteve normalidade.

O uso da dimetilacetamida (DMA) e da dimetilformamida (DMF) foi altamente deletério para os embriões de *Prochilodus lineatus*. Todas as concentrações avaliadas, resultaram em baixa sobrevivência ou 100 % de mortalidade (Figura 1.1).

Os tratamentos com Me_2SO_4 e MET permitiram elevadas taxas de sobrevivência nas concentrações de 1, 2 e 3M ($\text{Me}_2\text{SO}_4 = 84.8 \pm 5.5$; 75.5 ± 11 e $54.5 \pm 13\%$; MET = 88.0 ± 13 ; 65.8 ± 12 ; $56.66 \pm 14\%$, respectivamente). Reduzindo a sobrevivência embrionária a níveis inferiores a 50%, apenas em concentrações acima de 3M (Figura 1.1). Contudo, para o MET a solução na concentração de 4M, ainda mantém uma sobrevivência próxima a 50% ($49.6 \pm 16\%$), sendo reduzida drasticamente essa taxa a zero na concentração seguinte (Figura 1.1). O Glicerol

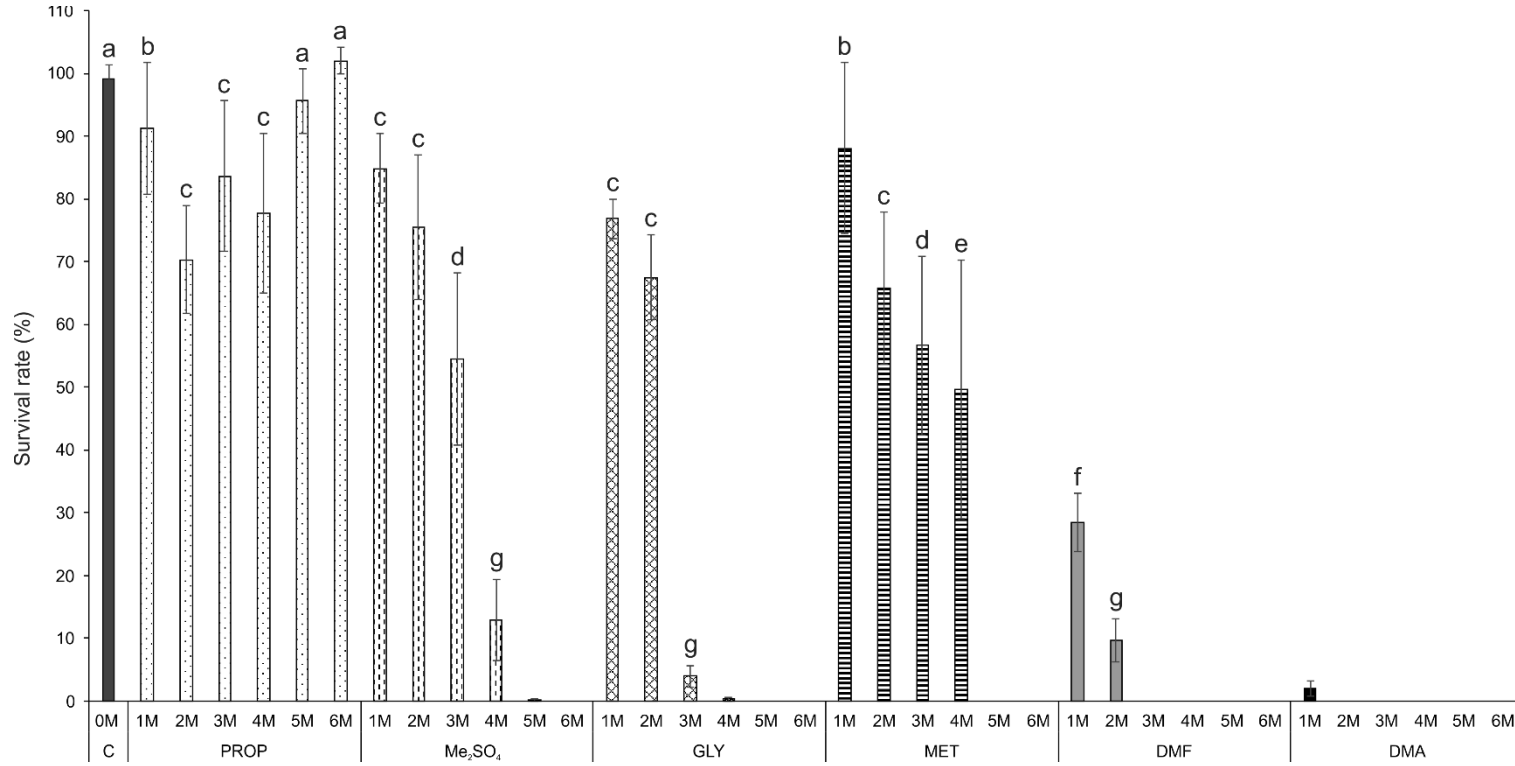
possibilitou elevada sobrevivência apenas nas concentrações de 1 e 2M (GLY = 76.8 ± 3.13 e $67.5 \pm 6.74\%$), reduzindo sua sobrevivência a 4% na concentração de 3M (Figura 1.1).

As taxas de sobrevivências foram inversamente proporcionais as concentrações dos crioprotetores permeáveis, sendo que, para o Me_2SO_4 , 83.6% ($\rho = -0.87$; $p = 0$) de sua sobrevivência pode ser explicado pela concentração do crioprotetor, dada pela reta de regressão, enquanto que para o GLY 86.8% ($\rho = -0.92$; $p = 0$) e o MET 64.7% ($\rho = -0.66$; $p = 2.6 \times 10^{-9}$) (Figuras 1.3-B, C e D, respectivamente).

A utilização de 1,2 Propanediol (PROP) proporcionou, em todos os tratamentos, elevadas taxas de sobrevivência (Figura 1.1). Não houve correlação entre seus dados ($p = 0.16$) (Figura 1.3A).

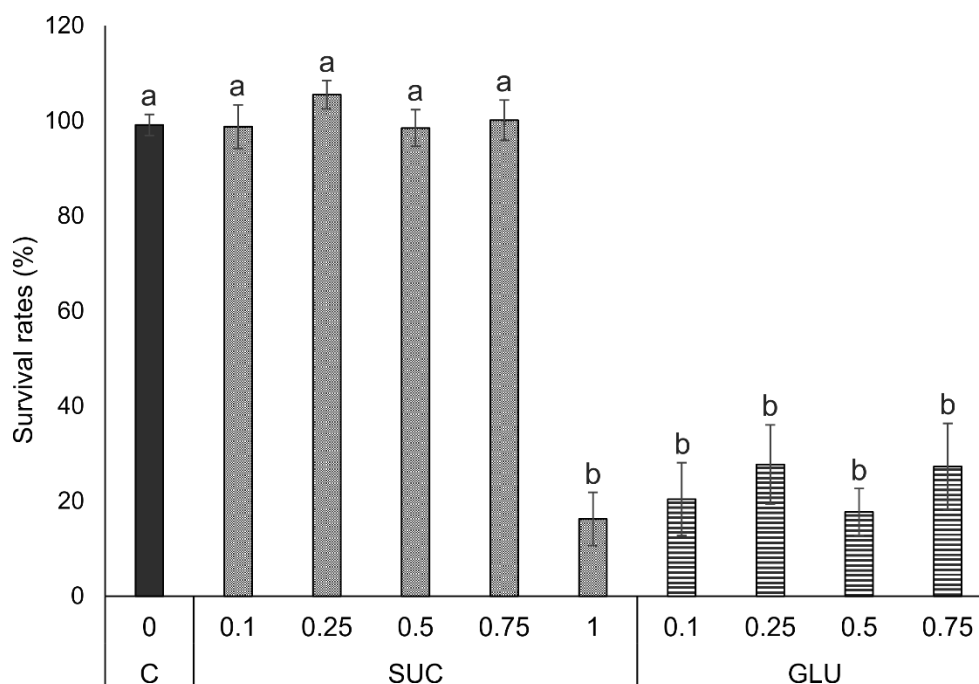
Dentre os crioprotetores não permeáveis, a glicose promoveu baixas taxas de sobrevivência em todas as concentrações avaliadas (Figuras 1.2). A sacarose propiciou índices semelhantes ao controle até a concentração de 0,75M, caindo para 16.57% quando atinge a concentração de 1M (Figura 1.2). Não foi possível associar as variáveis sobrevivência e concentração ($p\text{-value} = 0.22$).

Figura 1.1 - Sensibilidade embrionária aos crioprotetores permeáveis.



Fonte: Elaboração do próprio autor. Dimetilacetamida (DMA), dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (Me₂SO₄), glicerol (GLY), metanol (MET) e 1,2-Propanediol (PROP). Concentrações (1 – 6M). As letras diferentes indicam tratamentos diferentes. Os valores são médias ± erro padrão.

Figura 1.2 - Sensibilidade embrionária aos crioprotetores não permeáveis.

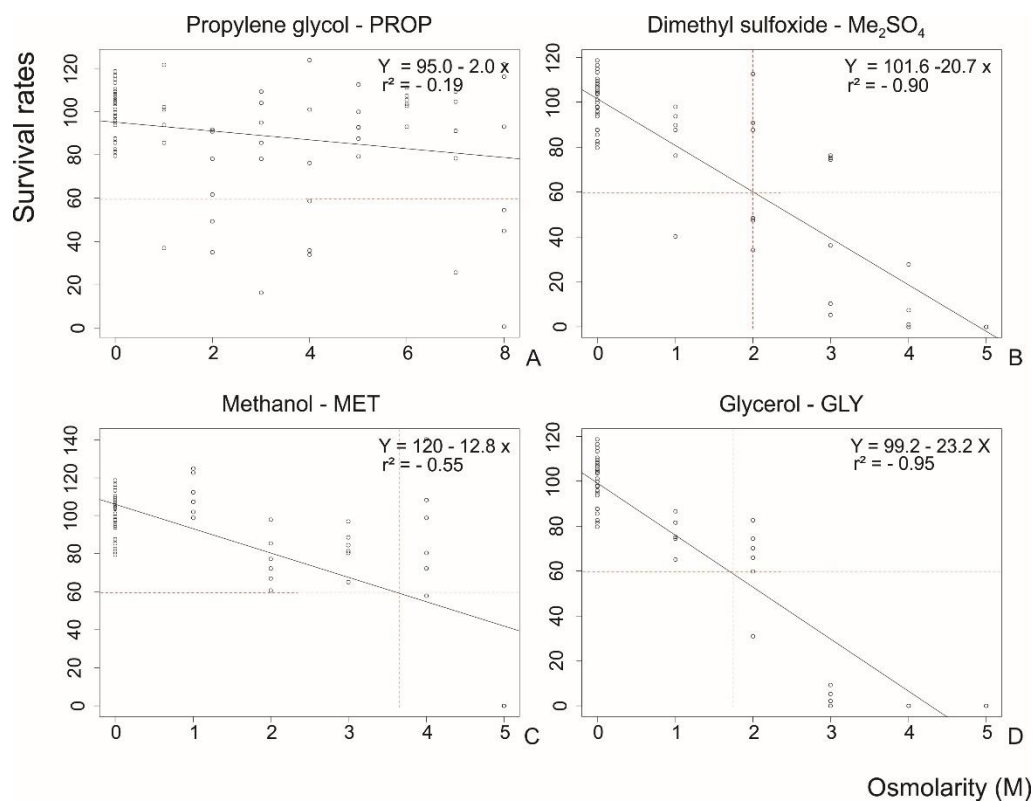


Fonte: Elaboração do próprio autor. Sacarose (SUC) e Glicose (GLUC). Concentrações (0.1 – 1M). As letras diferentes indicam tratamentos diferentes. Os valores são médias \pm erro padrão.

Solidificação e liquefação dos crioprotetores

Ao avaliar-se a solidificação das soluções escolhidas, verificou-se que o PROP [6M] foi a única solução a apresentar a uma conformação vítrea, possuindo apenas uma expansão de seu volume na região central (Figura 1.4 E), sendo também a solução a apresentar o menor tempo de descongelamento de 43 ± 5 s. A SAC [0,5M] (Figura 1.4 B) e o Me_2SO_4 [2M] (Figura 1.4 C) apresentaram a formação de cristais de gelo e um tempo de descongelamento superior ao PROP [6M], respectivamente 105 ± 84 e $76 \pm 8,8$ segundos. Mesmo quando as soluções eram combinadas (Figuras 1.4 D–F) o tempo de descongelamento aumentava e sempre apresentava a formação de gelo semelhante a água pura (Figura 1.4 A). Foi verificado que alguns dos processos permitiram a formação de trincas no sólido (Figura 1.4 A), não sendo apenas uma característica verificada na solidificação da água.

Figura 1.3 - Correlação de “Spearman” Concentração dos crioprotetores permeáveis X Sobrevivência.

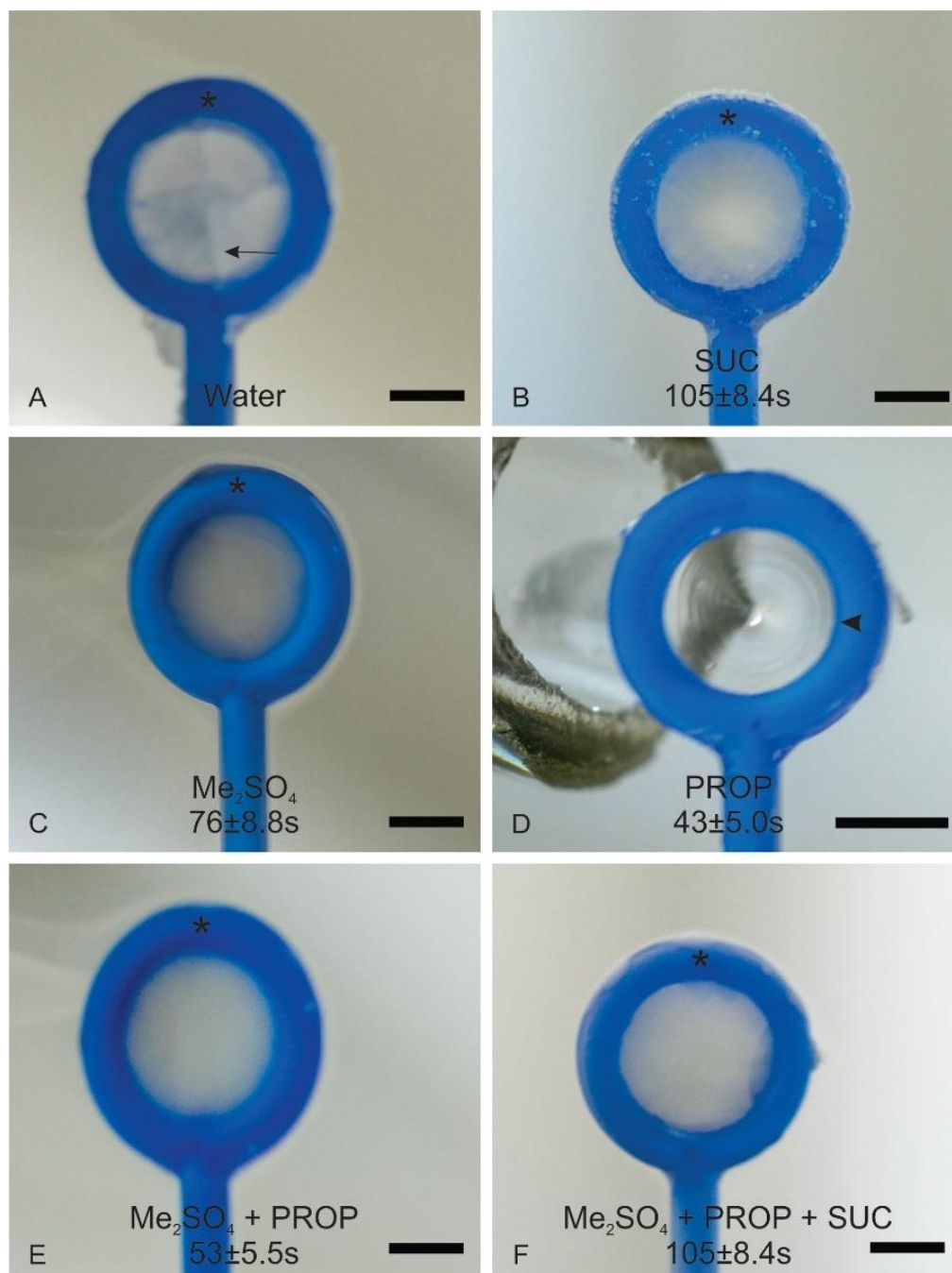


Fonte: Elaboração do próprio autor. A -D - Crioprotetores permeáveis. Cruzamento de Linhas Segmentadas - indicativo pela linha de tendência gráfica a concentração do crioprotetor que promoveria 50% de sobrevivência.

Incorporação dos crioprotetores

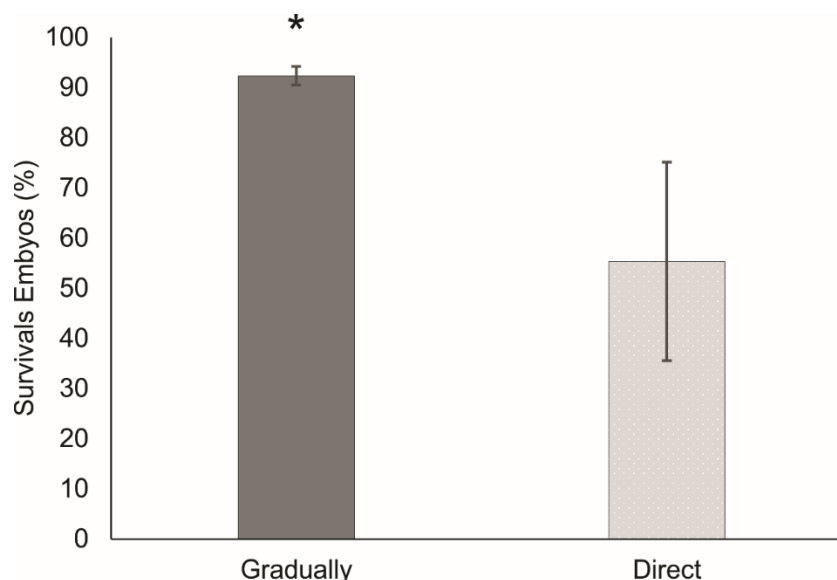
Os tratamentos apresentaram homogeneidade ($P = 0,8624$) e normalidade ($P = 0,1020$). Assim, observou-se que a exposição gradativa gerou maior taxa de sobrevivência embrionária ($92,3 \pm 3\%$) em comparação a inserção direta na solução vitrificante ($55,3 \pm 34\%$), gerando um aumento de 66,9% na taxa de sobrevivência (Figura 1.1).

Figura 1.4 – Capacidade vítrea e descongelamento das soluções crioprotetoras.



Fonte: Elaboração do próprio autor. A-F – Alça contendo 10 μ l de solução. A – Água (Congelada); B – Sacarose 0,5M (Congelada); C – Dimetilsulfóxido 2M (Congelada); D - 1,2-Propanediol (PROP [6M] / Vitrificada); E – Mistura (Me₂SO₄ [3M]+PROP[6M] / Congelada) e F - Mistura (Me₂SO₄ [3M]+PROP[6M] + SAC [0,5M] / Congelada). Média do tempo de descongelamento total da amostra após sua retirada do nitrogênio líquido (Média \pm Desvio Padrão). Temperatura de descongelamento 28 \pm 1°C. Seta – Crack; Asterisco – Solução congelada; Cabeça de seta -Solução vitrificada.

Figura 1.5 - Incorporação do crioprotetor.

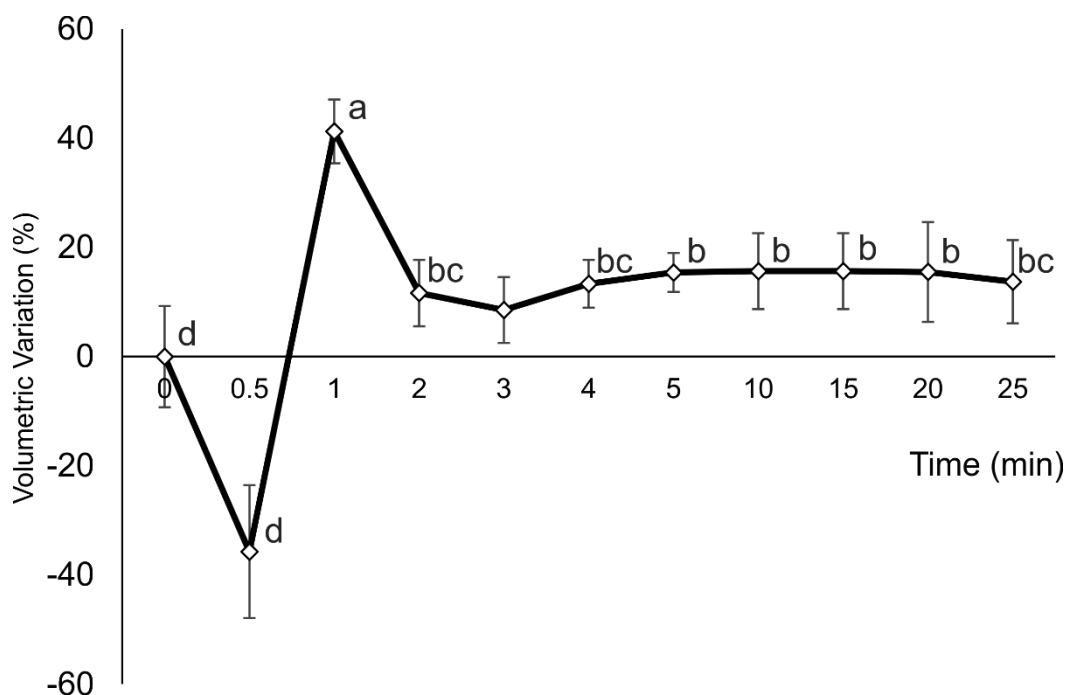


Fonte: Elaboração do próprio autor. Direct – embrião inserido diretamente em uma solução de 1,2-Propanediol a 4M. Gradually – embriões passam por uma série crescente de osmolaridade (1 a 4M). Índice de correção: $1/\arcseno(x)$ Asterisco indica diferença estatística. Student's test (P value =0,028). Os valores são médias \pm erro padrão.

Avaliação da Permeabilidade

Após submergir os embriões na solução de PROP, verificou-se grande variação no volume embrionário durante os dois primeiros minutos (Figura 1.6). Observa-se que o embrião, nos primeiros trinta segundos, sofre acentuada redução de seu volume (-35,7%), seguindo por um aumento no entorno de 41,24% nos 30 segundos seguintes. Posteriormente, seu volume oscila a cada medida, não estabilizando e não retornando as medidas iniciais (Figura 1.6). Observa-se que no primeiro minuto os embriões apresentam uma amplitude volumétrica no entorno de 76,94%.

Figura 1.6 - Variação volumétrica embrionária.



Fonte: Elaboração do próprio autor. Estágio de gástrula. Solução de 1,2-Propanediol 6 molar (PROP 6M). Dados percentuais relativos ao Volume no tempo zero (sem efeito da solução crioprotetora). Os valores são a diferença percentual entre o volume final e o volume inicial (tempo zero) \pm desvio padrão.

Discussão

A biotecnologia de criopreservação embrionária de peixes neotropicais esbarra em problemas como uma baixa relação área superfície, diferentes barreiras osmóticas na constituição embrionária e uma grande sensibilidade as baixas temperaturas, que dificultam ou inviabilizam grande parte dos testes realizados (VUTHIPHANDCHAI; PENGUN; NIMRAT, 2005). Visando mitigar os danos promovidos pela exposição dos embriões às baixas temperaturas, faz-se necessário o uso de soluções crioprotetoras nos processos de crioconservação, que protejam tanto externamente quanto internamente as estruturas embrionárias. Contudo, essas soluções podem apresentar efeitos deletérios aos organismos, podendo ser letais aos embriões dependendo de sua concentração, tempo de exposição e a fase de desenvolvimento embrionário utilizado (DINNYÉS et al., 1998; HAGEDORN et al., 1997; SUZUKI et al., 1995; URBÁNYI et al., 1997).

Assim, uma das formas de minimizar seus efeitos, pode ser conquistada utilizando fases mais avançadas no desenvolvimento embrionário. Contudo, esses estágios normalmente se mostram mais resistentes aos crioprotetores (DINNYÉS et al., 1998) e com estrutura morfológica complexa, apresentando três folhetos embrionários, que por sua vez já se organizam para originar órgãos e tecidos específicos (ROHDE; HEISENBERG, 2007; YIN; CIRUNA; SOLNICA-KREZEL, 2009), que dificultam a permeabilidade dos crioprotetores.

Em contrapartida, se pensarmos na utilização dos estágios iniciais, outros problemas dificultam os processos criogênicos. A existência de uma blastoderme agrupada no formato de uma massa celular, repousando sobre um sincício celular (camada sincicial de vitelo), reduz a área de superfície em contato com o meio, dificultando deste modo a penetração dos crioprotetores até as células do interior da blastoderme, uma vez que, a capacidade de difusão dos crioprotetores é influenciada pela área de contato com o meio (ADAMS; ZHANG; RAWSON, 2005; ALEXANDRE et al., 2009; HAGEDORN et al., 1997, 1998; NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2007; OLIVEIRA-ALMEIDA et al., 2014). Também, verifica-se que à adesão entre as células embrionárias, possivelmente se tornam maiores por expressão dos genes *Wnt11*, que regula a produção e a localização dos complexos de integrina (PUECH et al., 2005) a partir do estágio de gástrula, reduzindo a incidência de possíveis danos mecânicos a longo do processo.

Assim, optou-se neste trabalho pela utilização da fase de Gastrulação que apresenta características como uma elevada área de superfície, menor espessura da blastoderme e ausência de complexas estruturas internas (SOLNICA-KREZEL, 2006; YIN; CIRUNA; SOLNICA-KREZEL, 2009; ZALIK et al., 1999), facilitando a difusão das soluções crioprotetoras, permitindo reduzir o tempo de exposição aos crioprotetores.

Associado a escolha do estágio de desenvolvimento embrionário, busca-se também melhorar as taxas de sobrevivência embrionária, reduzindo os danos promovidos pela exposição às baixas temperaturas, protegendo as estruturas embrionárias tanto externamente quanto internamente, por meio do uso de soluções crioprotetoras (SUZUKI et al., 1995). Normalmente, observa-se que o seu uso promove ótimas taxas de sobrevivência em baixas concentrações, sendo inversamente proporcional ao aumento da sua concentração e tempo de exposição (DINNYÉS et al., 1998; HAGEDORN et al., 1997;

SUZUKI et al., 1995; URBÁNYI et al., 1997), fato também observado para embriões de *P. lineatus*.

Neste trabalho, observou-se que o Me_2SO_4 , MET e GLI promoveram taxas de sobrevivência superiores a 50% em concentração iguais ou inferiores a 3M, reduzindo seus índices proporcionalmente ao aumento de sua concentração. Assim, acredita-se que o uso isolado desses três químicos nos protocolos de vitrificação torna-se inviável, uma vez que, a concentração suportada pela espécie não permite a formação de uma estrutura vítrea. Acima das concentrações suportadas o aumento da mortalidade inviabiliza o procedimento antes mesmo de reduzir a temperatura. Contudo, o PROP demonstrou baixa toxidez aos embriões de *P. lineatus* permitindo ser utilizado em altas concentrações durante as avaliações de vitrificação.

É comum os experimentos utilizarem a associação de dois ou mais tipos de crioprotetores permeáveis e não permeáveis (ADAMS; ZHANG; RAWSON, 2005; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008; PAULA et al., 2014). Apesar das vantagens sugeridas pela literatura, como aumento da viscosidade dos líquidos, redução do ponto crioscópico e a capacidade de formar um sólido vítreo (KIRICHEK et al., 2016), essa mistura dificulta o entendimento das alterações promovidas por cada crioprotetor, que mesmo em baixas concentrações podem promover danos histológicos irreversíveis. Além disso, cada solução possui suas características químicas (DALCIN; LUCCI, 2010) que determinará um período necessário para realizar a troca de calor entre o embrião e o meio.

Desta forma, observou-se que o PROP 6M, quando utilizado isoladamente, possui capacidade de trocar, rapidamente, calor com o meio, permitindo a formação de um sólido vítreo pelo aumento da viscosidade da solução, formando um sólido translúcido com poucas áreas de dilatação. Contudo, ao combina-lo com outros crioprotetores, não permeável ou permeável, o tempo necessário para troca de calor aumentava interferindo na sua capacidade de formar um sólido vítreo ou ainda elevando a possibilidade de formação de cristais de gelo.

Após a vitrificação da solução, outro ponto crítico dentro dos protocolos de crioconservação é a capacidade de desvitrificar o sólido, que normalmente esbarra na formação e crescimento de cristais de gelo pelo fenômeno de recristalização. Assim, um dos resultados observado foi a inviabilidade no processo de desvitrificação, pois sempre que o material ganhava calor ele congelava (recristalizava) (NINHAUS-SILVEIRA et al.,

2008), sendo assim posteriormente descongelado, até a total liquefação do sólido. Desta forma, apesar de conseguirmos a formação de um sólido pela vitrificação continuamos descongelando-os o que possibilitam os danos pelos cristais de gelo.

A solução crioprotetora não somente permite a formação do sólido vítreo, como também promove a desidratação do material biológico por um processo de crenação embrionária, aumentando a concentração iônica interna e reduzindo os danos pela formação de grandes cristais de gelo. (HAGEDORN et al., 1998, 2002). Os embriões de *P. lineatus* foram altamente resistentes a amplitude volumétrica e ao estresse osmótico sofridos pela diminuição do volume embrionário durante as imersões nas soluções de 1,2 Propanediol 6M. Acredita-se que, possivelmente, o tempo em que os embriões apresentaram menor volume, e conseqüentemente a menor taxa hídrica, poderia ser um período adequado para o processo de vitrificação. Isso pois, devido a sua concentração interna ser mais elevada, o ponto crioscópico interno reduz dificultando a formação e crescimento de cristais de gelo, principalmente durante o processo de descongelamento auxiliando a minimizar os efeitos da recristalização.

Trabalhar com um volume inferior ao controle, pode tornar-se de grande valia uma vez que permitiria reduzir os danos promovidos pelo aumento de volume dos cristais de gelo formados no processo de vitrificação. Isso pois, ao cristalizarem, as moléculas da solução aumentam o seu volume, rompendo membranas, estruturas e a coesão entre os tecidos (HAGEDORN et al., 2004; NEVES et al., 2012). Junto a isso, pode-se conhecer a resistência do organismo frente a variação volumétrica durante os processos criogênicos, sem que fosse observado danos morfológicos.

Apesar de sua resistência, buscou-se para embriões de *P. lineatus* uma forma de reduzir o estresse osmótico através da elevação gradativa na concentração dos crioprotetores, que resultou no aumento da taxa de sobrevivência embrionária em 66,9%. Essa avaliação, permitiu associar a baixa toxidez do químico a uma forma de incorporação menos agressiva, promovendo superiores taxas de sobrevivência e uma maior homogeneidade nos tratamentos. Essa redução de estresse foi relatada durante o processo de criopreservação de embriões de *Paralichthys olivaceus*, que reduziram o estresse osmótico permitindo menores injúrias (CHEN; TIAN, 2005).

Desta forma, conclui-se que a utilização a solução crioprotetora 1,2-propanediol a 6 Molar, por possuir baixa toxicidade e atingir o estado vítreo, é um bom candidato a ser utilizado nos testes de vitrificação embrionária de *Prochilodus lineatus*.

Agradecimentos

Este trabalho contou com o financiamento da Fundação de amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) (Bolsas nº 2013/02588-5) e apoio técnico do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continental (CEPTA / ICMBio), com fornecimento dos reprodutores e instalações para o desenvolvimento experimental.

Bibliografia

- ADAMS, S. L.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. The effect of external medium composition on membrane water permeability of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, v. 64, n. 7, p. 1591–1602, 2005.
- ALEXANDRE, J. S. et al. Structural analysis of the embryonic development in *Brycon cephalus* (Günther, 1869). **Zygote (Cambridge, England)**, v. 18, n. 2, p. 173–83, maio 2009.
- BASHIYO-SILVA, C. et al. Hormonal induction of *Brycon cephalus* (Characiformes, Characidae) to spermiation using D-ala6, pro9net-mGnRH + metoclopramide. 2015.
- CABRITA, E. et al. Dimethyl sulfoxide influx in turbot embryos exposed to a vitrification protocol. **Theriogenology**, v. 60, p. 463–473, 2003.
- CHEN, S. L.; TIAN, Y. S. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. **Theriogenology**, v. 63, p. 1207–1219, 2005.
- DALCIN, L.; LUCCI, C. M. Criopreservação de embriões de animais de produção : princípios criobiológicos e estado atual. **revista brasileira reprodução animal**, p. 149–159, 2010.
- DINNYÉS, A. et al. Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants: work in progress. **Theriogenology**, v. 50, n. 98, p. 1–13, 1998.
- ESPINOZA, C.; VALDIVIA, M.; DUPRE, E. Morphological alterations in cryopreserved spermatozoa of scallop *Argopecten purpuratus*. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 38, n. 1, p. 121–128, 10 mar. 2010.

FORNARI, D. C. et al. Effect of cryoprotectants on the survival of cascudo preto (*Rhinelepis aspera*) embryos stored at -8 °C. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 22, n. 1, p. 58–63, fev. 2011.

GWO, J. C.; STRAWN, K.; ARNOLD, C. R. Changes in mechanical tolerance and chilling sensitivity of red drum (*Sciaenopus ocellatus*) embryos during development. **Theriogenology**, v. 43, n. 95, p. 1155–1161, 1995.

HAGEDORN, M. et al. Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. **Cryobiology**, v. 34, n. 3, p. 251–63, maio 1997.

HAGEDORN, M. et al. Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo. **Biology of reproduction**, v. 59, n. 5, p. 1240–50, nov. 1998.

HAGEDORN, M. et al. Altering Fish Embryos with Aquaporin-3: An Essential Step Toward Successful Cryopreservation. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 3, p. 961–966, 1 set. 2002.

HAGEDORN, M. et al. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option. **Cryobiology**, v. 49, n. 2, p. 181–9, out. 2004.

HARVEY, B.; KELLEY, R. N.; ASHWOOD-SMITH, M. J. Permeability of intact and dechorionated zebra fish embryos to glycerol and dimethyl sulfoxide. **Cryobiology**, v. 20, n. 4, p. 432–9, ago. 1983.

JARAMILLO, R. et al. Caracterización electroforética de las proteínas del corion normal Electrophoretic characterization for both normal and hard chorion proteins of *Salmo salar*. **medicina veterinaria**, v. 65, p. 59–65, 2012.

KIRICHEK, O. et al. Segregated water observed in a putative fish embryo cryopreservative Subject Category : Subject Areas : **Royal Society**, p. 1–9, 2016.

MULDREW, K.; MCGANN, L. E. **Mechanisms of intracellular ice formation.** **Biophysical journal**, mar. 1990. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3360586&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

NEVES, P. R. et al. Injuries in pacu embryos (*Piaractus mesopotamicus*) after freezing and thawing. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 22, n. 1, p. 25–31, fev. 2012.

NINHAUS-SILVEIRA, A. et al. Structural and ultrastructural characteristics of the yolk syncytial layer in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Teleostei; Prochilodontidae). **Zygote (Cambridge, England)**, v. 15, n. 3, p. 267–71, ago. 2007.

NINHAUS-SILVEIRA, A. et al. Cryogenic preservation of embryos of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote (Cambridge, England)**, v. 17, n. 1, p. 45–55, 2008.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; DE AZEVEDO, A. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote (Cambridge, England)**, v. 14, n. 3, p. 217–29, ago. 2006.

OLIVEIRA-ALMEIDA, I. R. et al. Structural analysis of embryogenesis of *Leiarius marmoratus* (Siluriformes: Pimelodidae). **Zygote**, p. 1–16, 12 set. 2014.

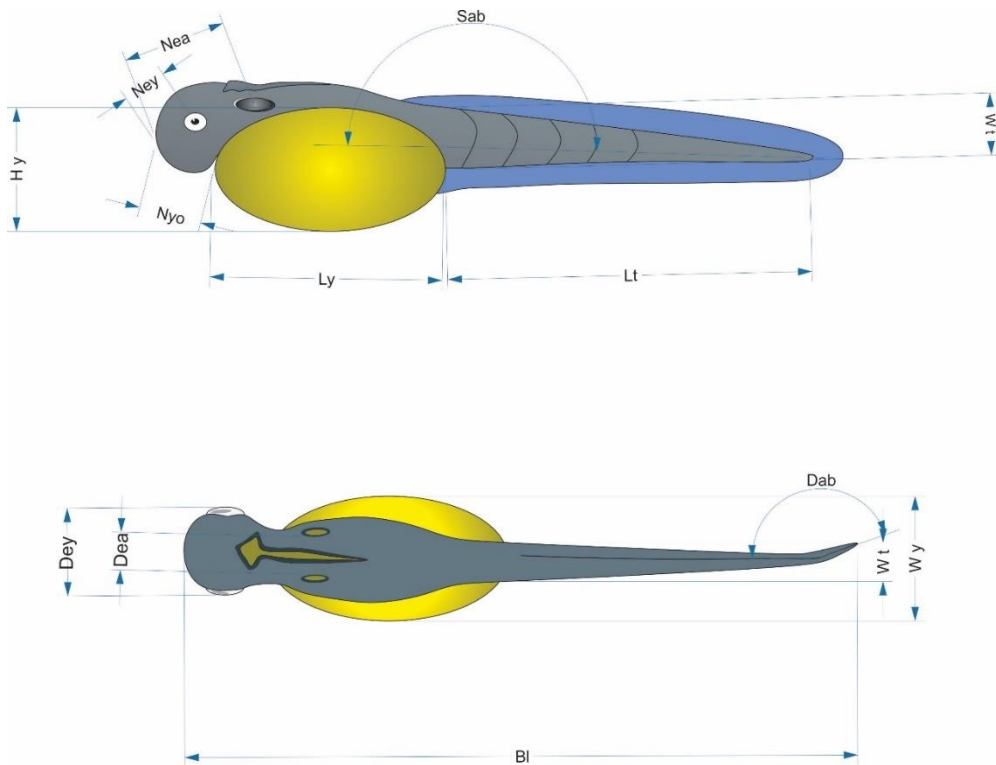
PAULA, D. A. J. et al. Toxicity of cryoprotectants on *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837) (curimba) embryos in an experimental incubator (Characiformes: Prochilodontidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 12, n. 4, p. 835–844, 2014.

PEGG, D. E. Cryobiology The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs q. v. 60, p. 36–44, 2010.

- PUECH, P.-H. et al. Measuring cell adhesion forces of primary gastrulating cells from zebrafish using atomic force microscopy. **Journal of cell science**, v. 118, n. Pt 18, p. 4199–4206, 2005.
- RAWSON, D. M. et al. Field emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy studies of the chorion , plasma membrane and syncytial layers of the gastrula-stage embryo of the zebrafish *Brachydanio rerio* : a consideration of the structural and functio. **Aquaculture Research**, p. 325–336, 2000.
- REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS-JR, C. J. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.
- RIZZO, E.; GODINHO, H. P.; SATO, Y. Short-term storage of oocytes from the neotropical teleost fish *Prochilodus marginatus*. **Theriogenology**, v. 60, n. 6, p. 1059–1070, out. 2003.
- ROBLES, V. et al. Vitrification of turbot embryos: preliminary assays. **Cryobiology**, v. 47, n. 1, p. 30–39, ago. 2003.
- ROBLES, V. et al. Embryo cryopreservation: What we know until now. In: ELSA CABRITA, VANESA ROBLES, P. H. (Ed.). **Methods in reproductive aquaculture: Marine and Freshwater Species**. New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2009. p. 265–294.
- ROHDE, L. A.; HEISENBERG, C. P. Zebrafish Gastrulation: Cell Movements, Signals, and Mechanisms. **International Review of Cytology**, v. 261, n. 07, p. 159–192, 2007.
- RUBINSKY, B.; PEGG, D. E. A mathematical model for the freezing process in biological tissue. **Proceedings of the Royal Society of London.**, v. 234, n. 1276, p. 343–58, 23 ago. 1988.
- SOLNICA-KREZEL, L. **Gastrulation in zebrafish - all just about adhesion? Current Opinion in Genetics and Development**, 2006.
- SUZUKI, T. et al. Relation between Fish Embryos Toxicity of Cryoprotectant DMSO and Its Concentration in several Fish embryos. **Fisheries Science**, v. 61, n. 2, p. 193–197, 1995.
- URBÁNYI, B. et al. Toxicity of methanol, DMSO and glycerol on carp (*Cyprinus carpio*) embryos in different developmental stages. **Theriogenology**, v. 47, p. 408, 1997.
- VUTHIPHANDCHAI, V.; PENGUN, B.; NIMRAT, S. Effects of cryoprotectant toxicity and temperature sensitivity on the embryos of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture**, v. 246, n. 1-4, p. 275–284, maio 2005.
- YIN, C.; CIRUNA, B.; SOLNICA-KREZEL, L. **Chapter 7 Convergence and Extension Movements During Vertebrate Gastrulation**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. v. 89
- ZALIK, S. E. et al. Cell adhesion and the actin cytoskeleton of the enveloping layer in the zebrafish embryo during epiboly. **Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire**, v. 77, p. 527–542, 1999.
- ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Studies on Chilling Sensitivity of Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Embryos. **Cryobiology**, v. 32, p. 239–246, 1995.
- ZILLI, L.; VILELLA, S. Effect of Cryopreservation on Bio-Chemical Parameters , DNA Integrity , Protein Profile and Phosphorylation State of Proteins of Seawater Fish Spermatozoa. In: KATKOV, I. I. (Ed.). **Current Frontiers in Cryobiology**. [s.l.] InTech, 2012. p. 592.

CAPÍTULO 2

Anomalias desenvolvidas pelos embriões de *Prochilodus lineatus* após exposição aos crioprotetores.



Raphael da Silva Costa

**Anomalias desenvolvidas pelos embriões de *Prochilodus lineatus* após
exposição aos crioprotetores.**

Raphael da Silva Costa ^{a,c}, Fabrício Marçal Silva de Souza ^a, José Augusto Senhorini ^b,
Cristiane Bashiyo-Silva^a, Rosicleire Verissimo Silveira ^a, Alexandre Ninhaus-Silveira ^{a*}.

^a Laboratório de Ictiologia Neotropical – LINEO, Depto de Biologia e Zootecnia, FEIS/UNESP –
Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Avenue Brasil, 56, 15085-000, Ilha Solteira, São
Paulo, Brazil. Phone: +55 018 37431285, Fax: +55 018 37422140

^b Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais at Instituto Chico Mendes da
Conservação de Biodiversidade – CEPTA/ICMBio, Pirassununga, São Paulo, Brazil

^c Pós-Graduação em Biologia Animal, IBILCE/UNESP/Campus de São José do Rio Preto, São Paulo,
Brazil

* Corresponding author. Tel: +551837434388.

E-mail address: costa_rs@yahoo.com.br

Resumo

A criopreservação é uma técnica que, com auxílio de crioprotetores e baixas temperaturas, permite preservar a diversidade genética dos seres vivos por tempo indeterminado. Este trabalho objetivou avaliar o efeito dos crioprotetores sobre o desenvolvimento embrionário de *Prochilodus lineatus* no estágio de gastrulação. Cinco classes de anomalias foram padronizadas (massa celular, alterações vitelínicas, curvatura corpórea, alteração de tamanho, rompimento tecidual), baseando-se na distribuição gaussiana da morfometria de vinte embriões normais. Seis repetições com $119 \pm 9,7$ embriões foram expostos por vinte minutos aos crioprotetores permeáveis dimetilsulfóxido- Me_2SO_4 , dimetilacetamida-DMA, dimetilformamida-DMF, metanol-MET, glicerol-GLY e 1,2 Propanediol-PROP nas concentrações de 1M, 2M, 3M, 4M, 5M e 6M; e a dois crioprotetores não permeáveis (sacarose-SUC e a glicose-GLU), nas concentrações de 0,1, 0,25, 0,50, 0,75 e 1M. A frequência de anormalidades aumentou junto a osmolaridade dos químicos, contudo não foi possível encontrar especificidade entre as classes de anomalias e os crioprotetores. Externamente observou-se embriões com redução no tamanho corporal devido a deficiência no processo miogênico, curvatura corpórea, acefalia ou ausência de cauda; retração vitelínica demonstrando um aumento na região pericárdica; divisão do blastoderme devido ao não fechamento do sulco neural; microfissuras e micro dobras na camada sincicial de vitelo (YSL), que podem promover o rompimento da YSL com escape de vitelo. Esses resultados mostram que apesar da necessidade do uso dos crioprotetores nos protocolos criogênicos, seus efeitos deletérios podem gerar danos ao desenvolvimento embrionário, que inviabilizam a reconstituição da espécie. Assim esses dados auxiliam na descrição de novos protocolos que busquem reduzir esses efeitos indesejáveis, auxiliando toda biotecnologia da criopreservação.

Palavras-chave: Toxicidade, Crioprotetores, Gástrula, Biotecnologia, Preservação.

Introdução

A criopreservação é uma técnica biotecnológica que permite preservar o material biológico sob baixas temperaturas. Avalia-se que, em temperaturas no entorno de -196°C , não há energia térmica suficiente para as reações químicas (MAZUR, 1984), promovendo uma pausa no tempo biológico do organismo. Essa metodologia obteve seu primeiro êxito com a vitrificação de espermatozoides de coelho (POLGE; SMITH; PARKES, 1949), tornando-se hoje uma técnica comum nas áreas médicas (NOTTOLA et al., 2007), pecuária (YASHIRO et al., 2015) e aquicultura (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008), pois permite a manutenção da diversidade genética de animais domésticos e selvagens (GROENEVELD et al., 2010; OLLIVIER et al., 2005; SHIVAJI et al., 2003), facilita a distribuição de linhagens genéticas de animais domésticos, formar bancos genéticos para pesquisas (INOUE et al., 2012), e de forma ex-situ, permite a conservação genética da espécie (OGONUKI et al., 2003; YASUI et al., 2011).

Na piscicultura esta biotecnologia é bem estabelecida apenas para espermatozoides (VIVEIROS; GODINHO, 2009; YASUI et al., 2009) e blastômeros (LIN; ZHANG; RAWSON, 2009; YASUI et al., 2011), mantendo-se inviável ainda para oócitos e embriões. Um dos seus principais entraves é a nucleação e o crescimento dos cristais de gelo (GUAN; RAWSON; ZHANG, 2008; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008; ROBLES et al., 2009), que ocasiona a ruptura tecidual e nas membranas inviabilizando o material congelado (HAGEDORN et al., 2004; RUBINSKY; PEGG, 1988). Além da nucleação dos cristais de gelo, as baixas temperaturas geram alterações no metabolismo celular devido à alta sensibilidade dos gametas e embriões ao frio (ESPINOZA; VALDIVIA; DUPRÉ, 2010; ZHANG; RAWSON, 1995). Essas alterações, podem ser promovidas por danos ao material genético ou por desnaturação de importantes proteínas, culminando em anomalias no desenvolvimento ontogenético ou morte embrionária (ZILLI; VILELLA, 2012).

Assim, os tratamentos sob baixas temperaturas necessitam do uso de soluções crioprotetoras específicas inibindo o crescimento destes cristais e protegendo os componentes celulares dos danos gerados pelas baixas temperaturas (NEVES et al., 2012; ROBLES et al., 2003; ZILLI; VILELLA, 2012). Contudo, apesar da necessidade das soluções crioprotetoras, os embriões de peixes podem ser sensíveis aos agentes crioprotetores tradicionalmente utilizados, sendo esta toxicidade aumentada junto ao tempo de exposição, temperatura, concentração e o estágio de embrionário (SUZUKI et al., 1995;

ZHANG; RAWSON, 1995) podendo assim, promover graves anomalias morfológicas (NEVES et al., 2012). Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito dos principais crioprotetores sobre o desenvolvimento embrionário de *Prochilodus lineatus*, no estágio de gastrulação.

Material e métodos

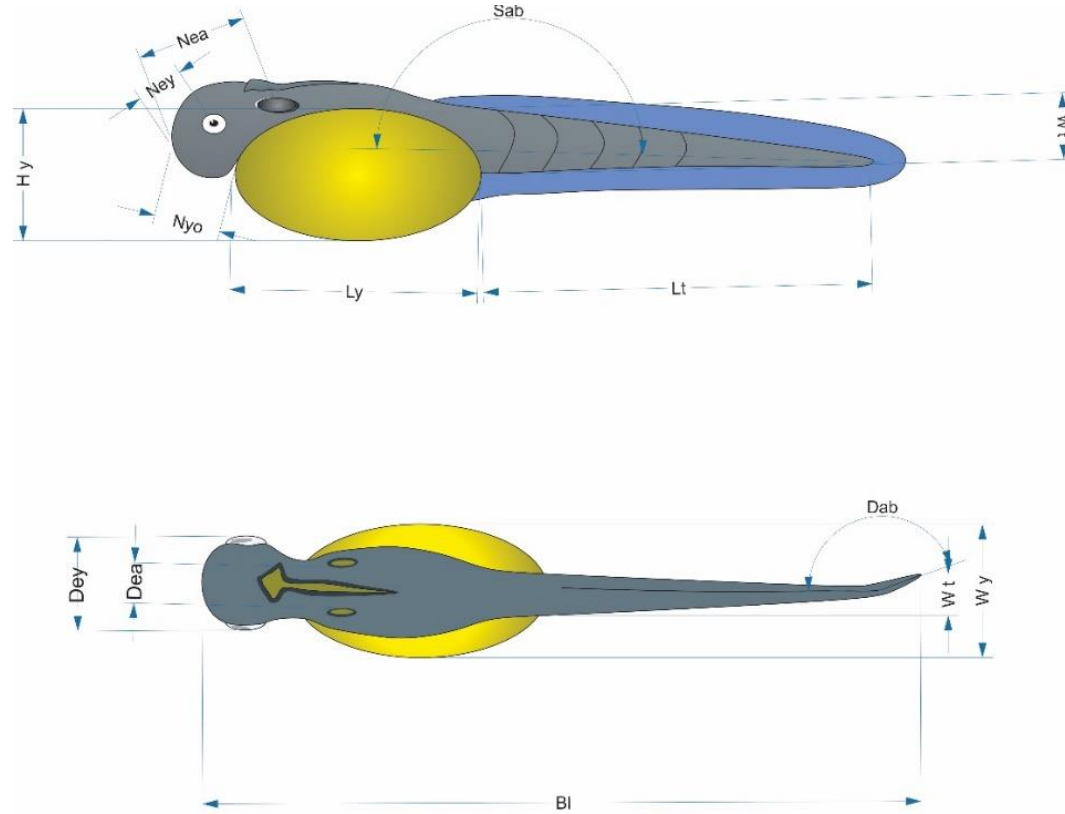
Embriões

O manejo dos reprodutores e a obtenção dos embriões ocorreram conforme a descrição do capítulo 1.

Normalização dos parâmetros morfométricos para embriões de Prochilodus lineatus

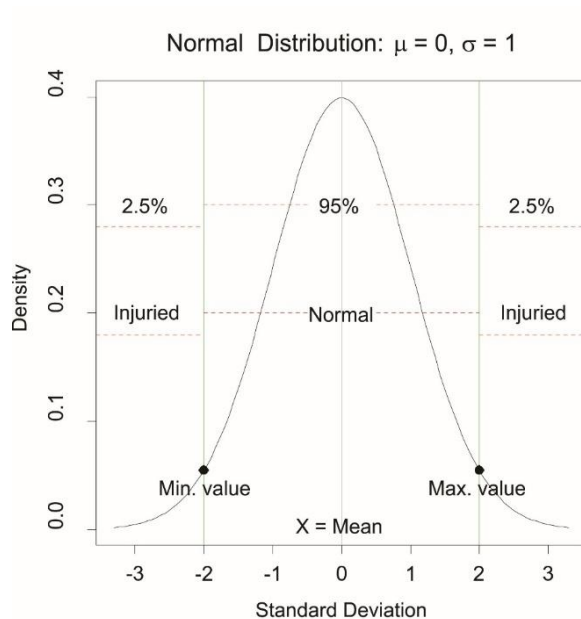
Para gerar os parâmetros de normalidade nos embriões tratados, utilizou-se vinte embriões com 15 horas de desenvolvimento e sem qualquer deformação morfológica externa aparente. Destes, 14 caracteres morfológicos foram mensurados (Figura 2.1), determinando suas medias (\bar{x}) e desvios padrão (sd). Sobre os dados medidos, aplicou-se o teste de normalidade de Shapiro Wilk, garantido que as medidas apresentassem uma distribuição normal. Assim, considerou-se uma faixa de normalidade para cada um dos caracteres representada pela $\bar{x} \pm 2sd$ (95%), sendo todas as medidas fora desta faixa entendidas como anormais (Figura 2.2).

Figura 2.1 - Aspectos morfométricos dos embriões no estágio de eclosão.



Fonte: Elaboração do próprio autor. Ângulo lateral do corpo - Sab; Altura do vitelo - Hy; Distância entre nariz e vesícula ótica - Nea; Distância entre o nariz e os olhos - Ney; Distância entre o nariz e o vitelo - Nyo; Comprimento do vitelo - Ly; Comprimento da cauda - Lt; Largura do vitelo - Wy; Ângulo dorsal do corpo - Dab; Distância entre os olhos - Dey; Distância entre as vesículas óticas - Dea; Largura da cauda - Wt e Comprimento do corpo - Bl.

Figura 2.2 - Curva padrão da distribuição normal.



Fonte: Elaboração do próprio autor. Curva padrão da distribuição normal, considerando sua média amostral e os valores máximos e mínimos, atingindo 95% das amostragens.

Sensibilidade aos Crioprotetores

Cada tratamento iniciou com a permeabilização da membrana coriônica, através da enzima Pronase-E (0,2M por 10seg) (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008), sendo posteriormente expostos, por 20 minutos (SUZUKI et al., 1995), a seis soluções crioprotetoras internas (dimetilsulfóxido-Me₂SO₄, dimetilacetamida-DMA, dimetilformamida-DMF, metanol-MET, glicerol-GLY e 1,2 Propanediol-PROP) nas concentrações de 1M, 2M, 3M, 4M, 5M e 6M; e dois crioprotetores não permeáveis (sacarose-SUC e a glicose-GLU), nas concentrações de 0,1, 0,25, 0,50, 0,75 e 1M. Por fim, foram lavados em água corrente e acondicionados em tanques de fluxo contínuo por um período de doze horas, sendo por fim fixados (15 horas após a fecundação) em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2%.

Estereomicroscopia

As amostras fixadas em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2% eram lavadas em solução de álcool 70%, hidratadas, coradas com Hematoxilina por 20 segundos e

diferenciadas em solução aquosa de ácido clorídrico (1%) até o vitelo atingir uma tonalidade amarelada e distinta da blastoderme. Após corados, os embriões foram analisados e fotografadas “in toto” através do estereomicroscópio Leica M212 com sistema de fotográfico MOTICAM 2500 – 5.0 MPixel USB 2.0.

Histologia

Os embriões foram fixados, impregnados em metacrilato glicol (Historesina Leica), submetido a cortes de 3 µm de espessura, obtidos por meio de um micrótomo equipado com navalha de vidro LEICA RM 2245, e corados com Hematoxilina-Eosina. Os cortes assim preparados foram observados ao Microscópio óptico Zeiss Axio Scope A1 e fotografadas com máquina fotográfica Axiocam MRc5.

Análise estatística

Todos os tratamentos foram realizados inteiramente ao acaso e avaliados utilizando o software “R Development Core Team (2010)”. Os testes de “sensibilidade aos crioprotetores” contaram com seis repetições contendo $119 \pm 9,7$ embriões por amostra enquanto as avaliações de “Normalização dos parâmetros normais ” contaram com 20 repetições. Aplicou-se os testes de Bartlett e Shapiro-Wilk seguido pelo teste de Kruskal Wallis.

Resultados

Normalização dos parâmetros morfométricas para embriões de Prochilodus lineatus

Dos quatorze caracteres morfométricos mensurados, onze padrões de normalidade foram descritos para as avaliações morfométricas (Figura 2.3), categorizando quatro das cinco classes de deformidades utilizadas (Tabela 2.1). A quinta classe baseou-se no rompimento dos tecidos embrionários.

Injúrias

A frequência das deformidades, para a maioria dos crioprotetores, aumentou junto a osmolaridade dos químicos, reduzindo posteriormente seus valores (Figura 2.4 e 2.5). Ao categorizar e quantificar suas classes, observa-se que em sua maioria, os defeitos são comuns a todos os crioprotetores e ao controle (Figura 2.6), alterando em alguns casos a frequência de ocorrência de acordo com o tratamento.

Doze horas após os tratamentos, os embriões apresentavam suas estruturas morfológicas externas definidas, sendo facilmente distinguível olhos, vesícula ótica, presença de somitos, uma cauda proporcionalmente longa e reta (Figura 2.7 A). Dorsalmente, é possível observar o fechamento do sulco neural delimitado pelas dobras neurais (Figura 2.7 B).

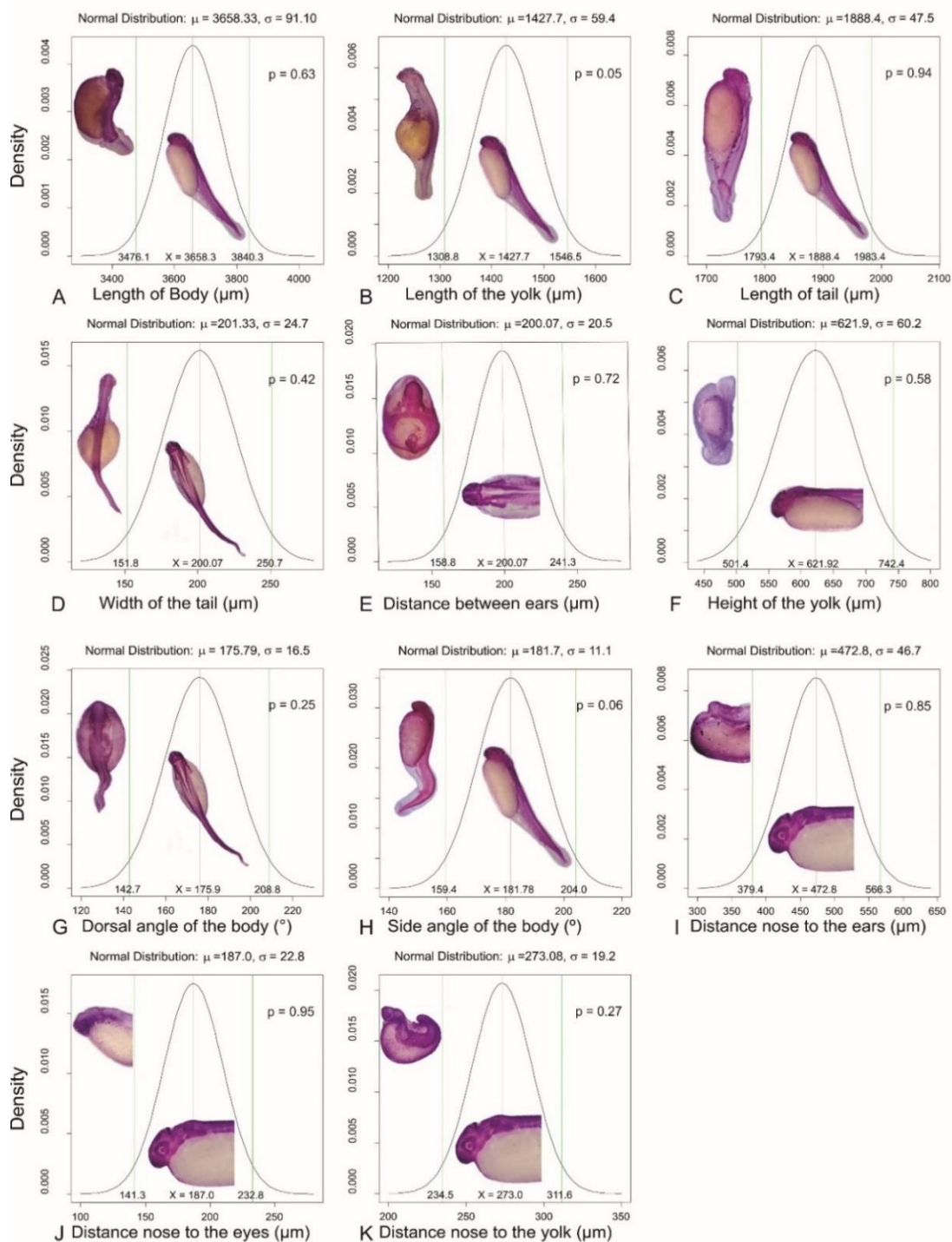
Entretanto, muitos embriões expostos aos crioprotetores apresentaram estruturas morfológicas com desenvolvimento anômalo, resultando em indivíduos com tamanho reduzido (Figura 2.7 C); acéfalos (Figura 2.7 D); apresentando retração do vitelo (Figura 2.7 E), e bipartição do blastoderme (Figura 2.7 F).

Tabela 2.1 - Classes de injúria – Angulação lateral do corpo - Sab; Altura do saco vitelínico - Hy; Distância entre o nariz e a vesícula ótica - Nea; Distância entre o nariz e os olhos - Ney; Distância entre o nariz e a vesícula vitelínica - Nyo; Comprimento do vitelo - Ly; Comprimento da cauda – Lt; Largura da vesícula vitelina – Wy; ângulo dorsal do corpo - Dab; Distância entre os olhos - Dey; Distância entre as vesículas óticas - Dea; Largura da Cauda – Wt e Comprimento corpóreo – Bl.

Classes de injúrias	Caracteres morfométricos anormais			
	Ney	Dea	Nea	Nyo
Massa celular	Ney	Dea	Nea	Nyo
Alterações vitelínicas	Ly	Hy	--	--
Curvatura corpórea	Dab	Sab	--	--
Comprimento total alterado	Bl	Lt	Wt	--
Rompimento tecidual	--	--	--	--

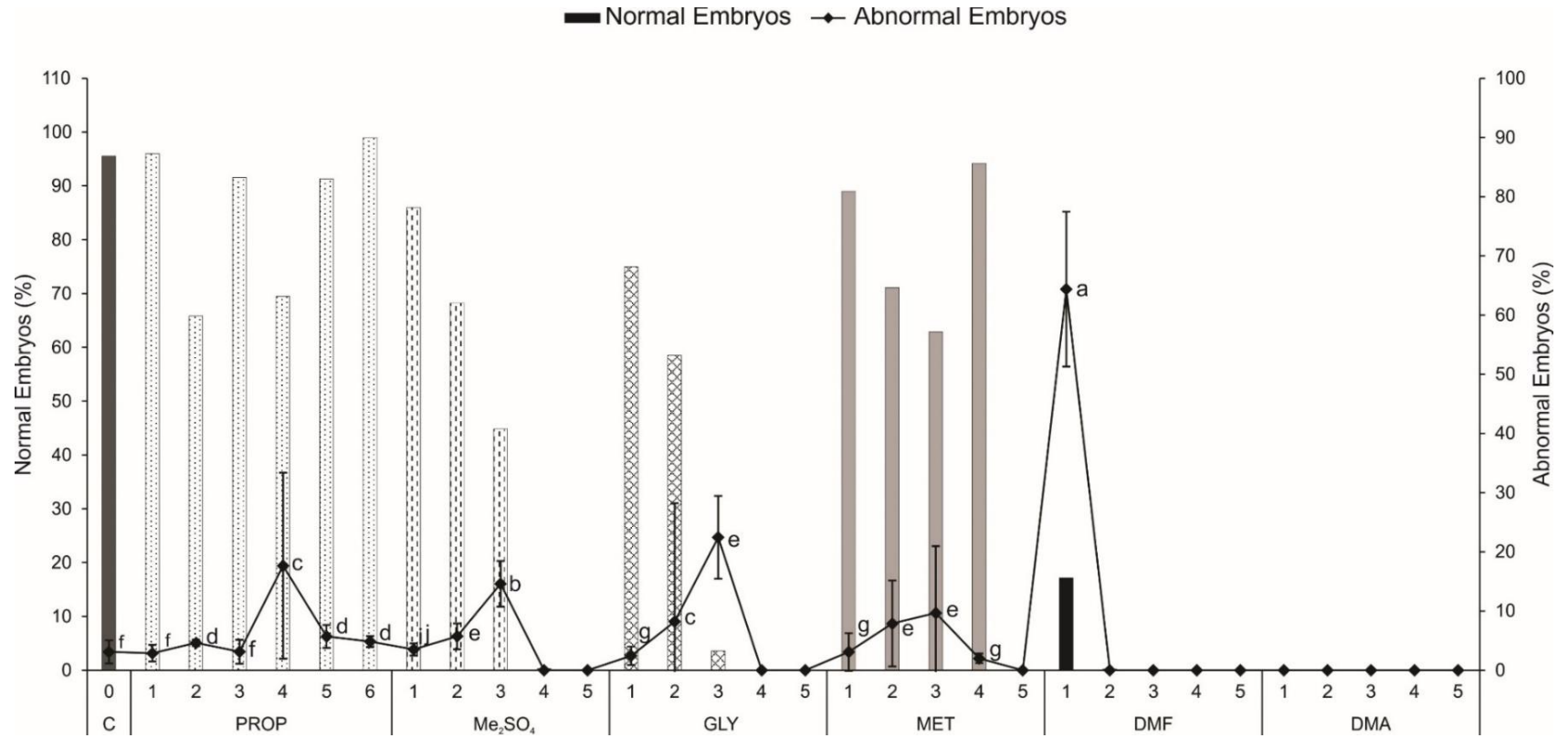
Fonte: Elaboração do próprio autor.

Figura 2.3 - Distribuição normal dos caracteres morfológicos.



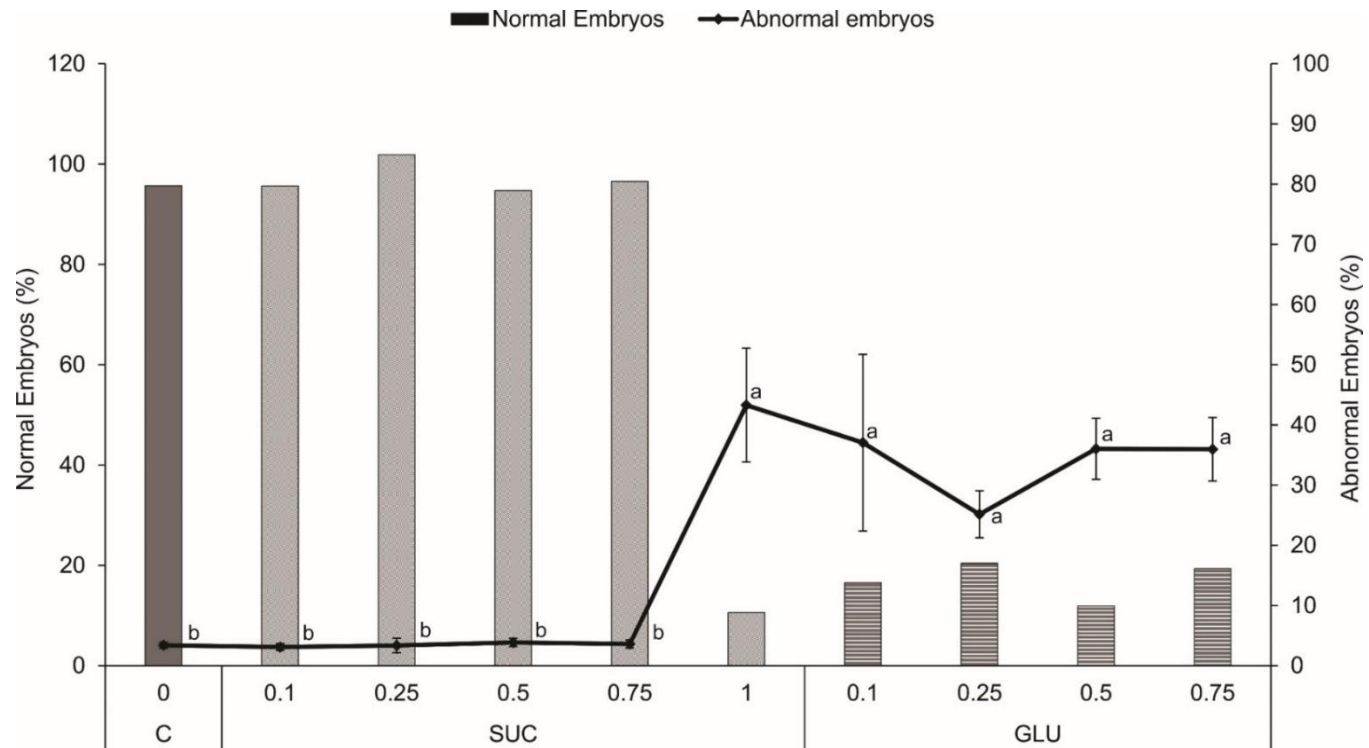
Fonte: Elaboração do próprio autor. A – K – Parâmetros morfométricos dos embriões de *Prochilodus lineatus*

Figura 2.4 - Taxa de anormalidade embrionária relativa de *Prochilodus lineatus*, após a exposição aos crioprotetores permeáveis.



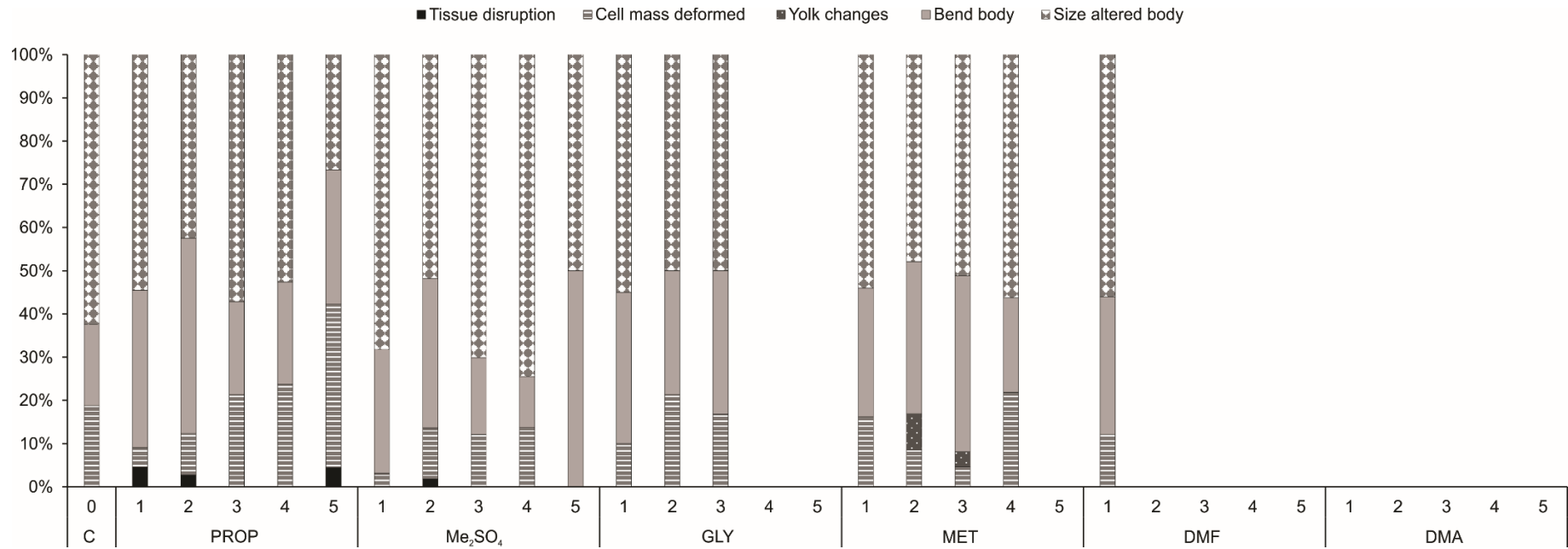
Fonte: Elaboração do próprio autor. Controle - C; 1,2-Propanodiol - PROP; Dimetilsulfóxido - Me₂SO₄; Glicerol - GLY; Metanol (MET); Dimetilformamida (DMF); Dimetilacetamida (DMA). As letras minúsculas comparam estatisticamente as médias. Todas as amostras continham 119 ± 9,7 indivíduos. Os dados são apresentados como percentagem relativa ao controle (média ± desvio padrão).

Figura 2.5 - Taxa de anormalidade embrionária relativa de *Prochilodus lineatus*, após a exposição aos crioprotetores não permeáveis.



Fonte: Elaboração do próprio autor. Controle - C; Sacarose - SUC; Glucose - GLU. As letras minúsculas comparam estatisticamente as médias amostrais. Todas as amostras continham $119 \pm 9,7$ indivíduos. Os dados são apresentados como porcentagem relativa ao controle (média \pm desvio padrão).

Figura 2.6 - Categorização das Injúrias por solução crioprotetora.



Fonte: Elaboração do próprio autor. Controle-C; 1,2-Propanediol - PROP; Dimetilsulfóxido - Me₂SO₄; Glicerol - GLY; Metanol (MET); Dimetilformamida (DMF); Dimetilacetamida (DMA). Concentrações (1 - 5)..

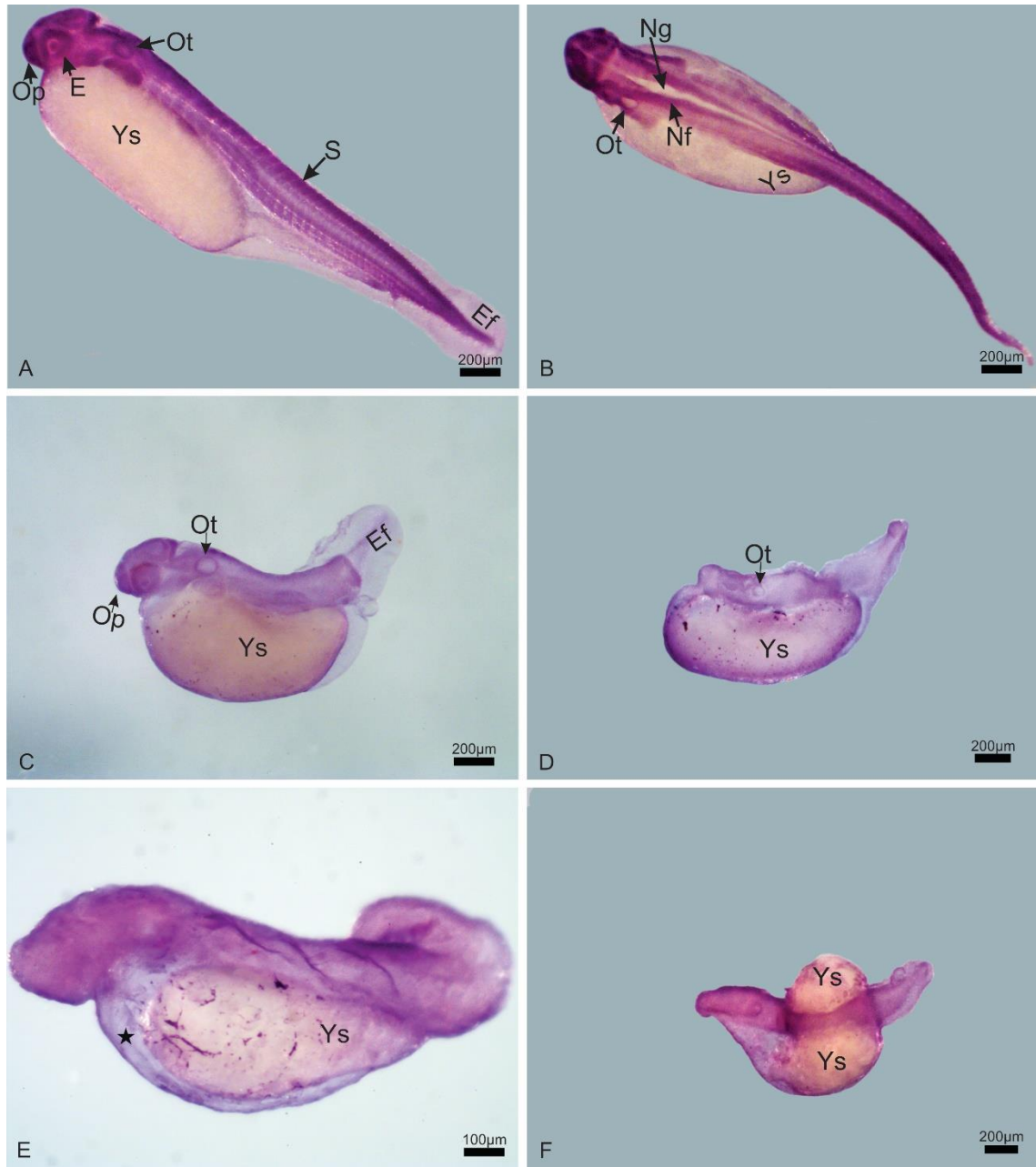
A curvatura corpórea é uma das anomalias mais frequente em todos os tratamentos (Figura 2.8 A). Para o PROP e MET verificou-se um aumento de 106% e 218% dessa classe de injúria nas concentrações 2M e 3M, respectivamente (Figura 2.6). No grupo do Me₂SO₄ (5M) essa classe chega a acometer 50% dos embriões injuriados. Outra anomalia comum, é a presença de massas celulares na musculatura (Figura 2.8 B). Normalmente, a musculatura embrionária possui um aspecto ordenado pelo enfileiramento de mioblastos e por septos de tecido conjuntivo (Figura 2.8 E). Contrariamente, essas massas celulares são formadas por grupos de mioblastos desordenados sem nenhuma delimitação aparente (Figura 2.8 F).

A vesícula vitelina demonstrou fragilidade aos tratamentos, permitindo o escape do vitelo para o ambiente (Figura 2.9 A) devido ao rompimento da YSL (Figura 2.9 B). Normalmente, o vitelo é confinado em uma vesícula delimitada por um sincício celular e um epitélio, ambos apresentando um contorno claro sem a presença de reentrâncias e dobras (Figura 2.9 C). Nos casos de lesões na vesícula vitelina, observa-se a conformação de micro dobras (Figura 2.9 D) e microfissuras (Figura 2.9 E). Em casos mais extremos, verifica-se regiões da YSL totalmente desestruturadas e com núcleos anormais (Figura 2.9 F).

O rompimento da YSL também foi encontrado na região dorsal do embrião. Alguns embriões apresentam sua blastoderme dividida e unida a vesícula vitelina (Figuras 2.10 A - B). Essa conformação está presente em todos os tratamentos avaliados, sendo as maiores frequências encontradas nas concentrações mais elevadas dos crioprotetores. Apesar desta categoria se mostra como uma junção de erros no desenvolvimento embrionário, pode-se encontrar estruturas integras como olhos (Figura 2.10 C) e vesícula ótica (Figura 2.10 D). Contudo, observa-se aqui embriões com mioseptos desalinhados (Figuras 2.10 E-F) e grande proporção de morte celular (Figura 2.10 F).

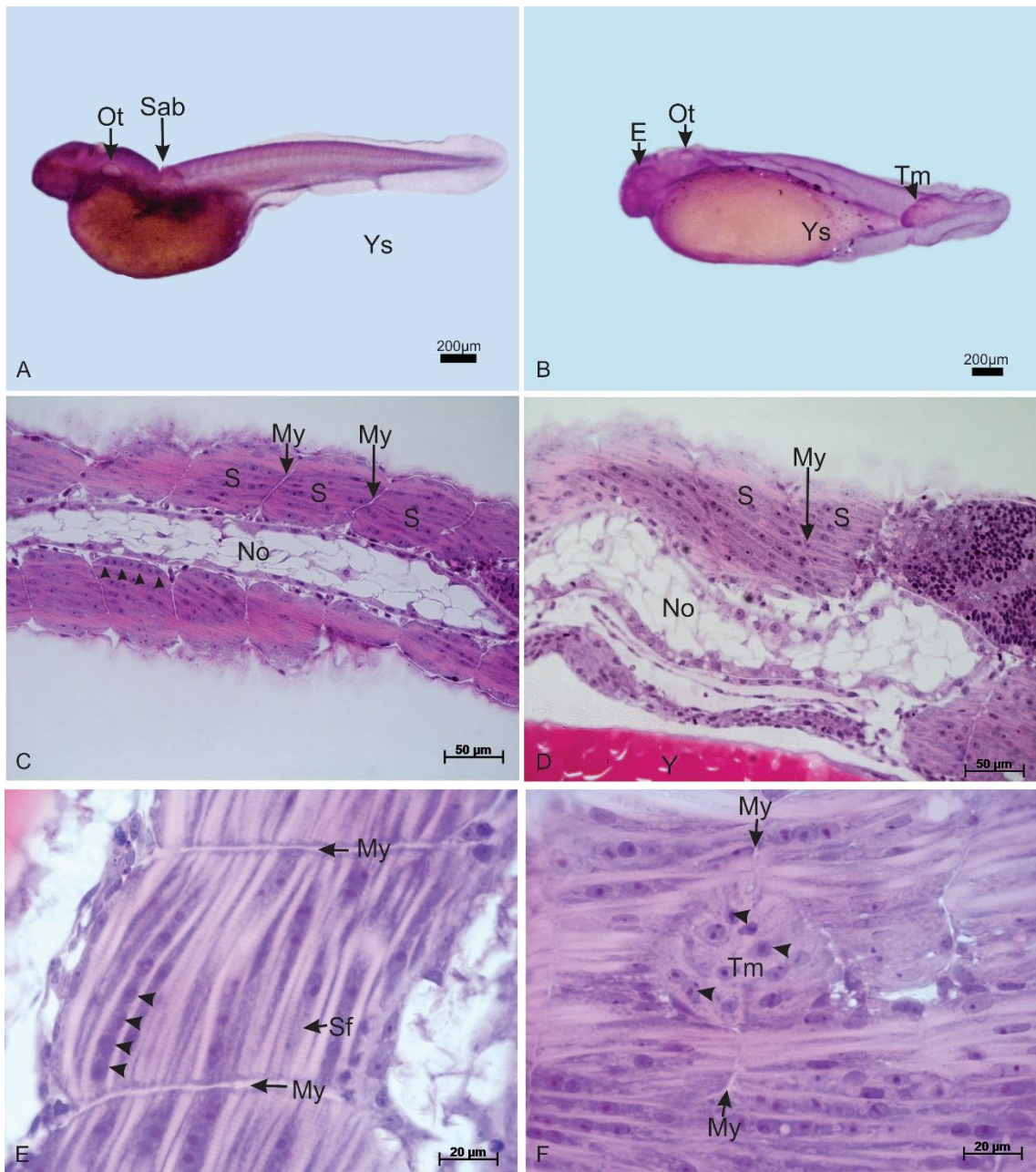
Por fim, a redução no tamanho corpóreo, se mostrou uma associação de anomalias. Assim, verifica-se que esses organismos possuíam grande quantidade de morte celular, curvatura corpórea e má formação no processo miogênico, e que juntas essas injúrias reduzem o tamanho embrionário.

Figura 2.7 - Análise morfológica de *Prochilodus lineatus* após os tratamentos crioprotetores.



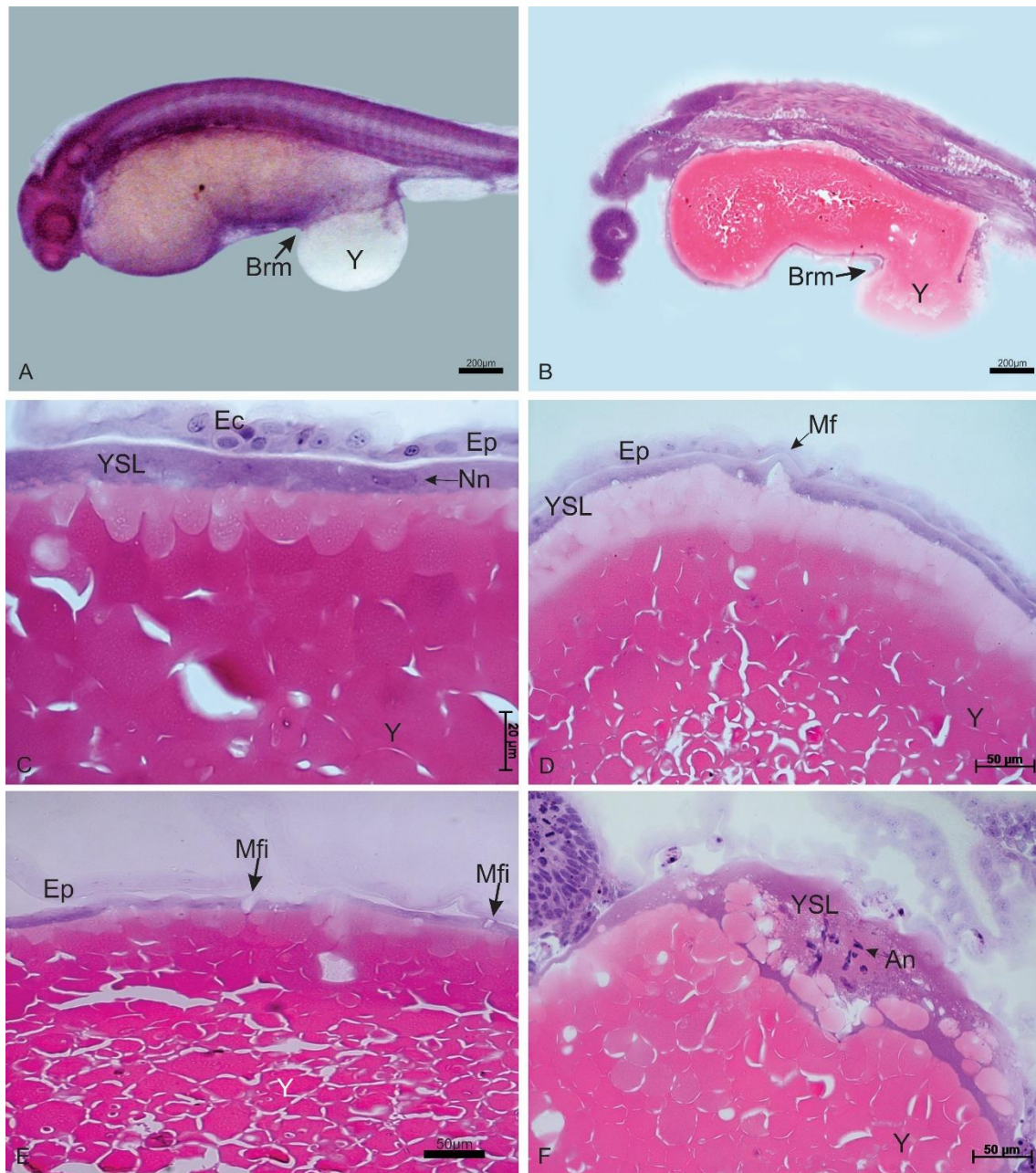
Fonte: Elaboração do próprio autor. A e B - Controle; C - Comprimento da cauda anormal após GLY [1M]; D - Acefalia após MET [3M]; E - Retração de gema após MET [2M]; F - Dorsal divisão de blastoderme em DMF [1M]. Vesícula ótica - Ot; Placode olfativo - Op; Olho - E; Saco vitelínico - Ys; Somitos - S; Nadadeira embrionária - Ef; Sulco neural - Ng; Dobras neurais - Nf; Retenção vitelina - Estrela..

Figura 2.8 - Análise morfológica e histológica de embriões do corpo curvado e massa de celular anômala.



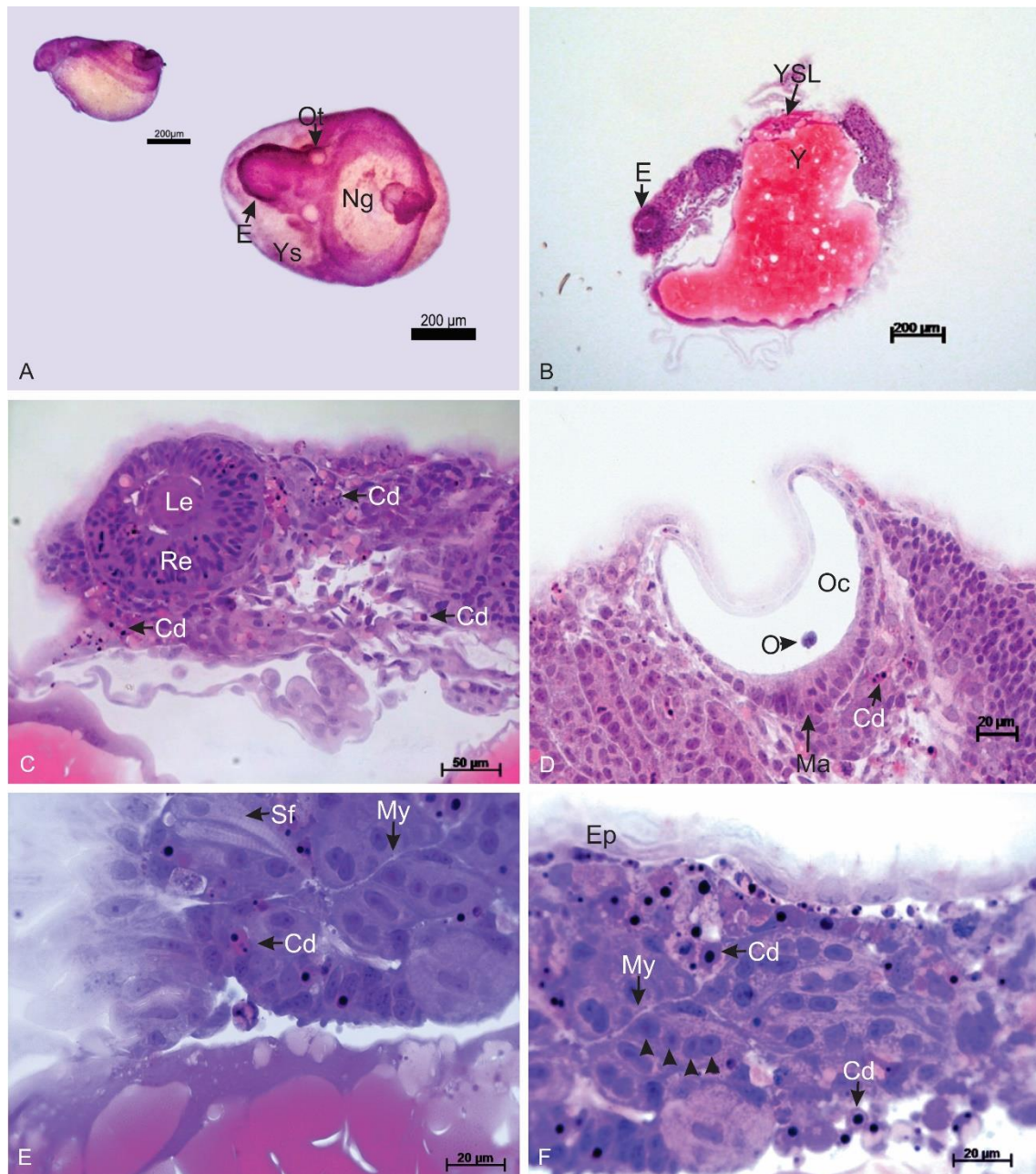
Fonte: Elaboração do próprio autor. A – Curvatura corpórea após o PROP [2M]; B - Massa de celular sem forma na cauda após MET [3M]; C - Notocorda retilínea - Controle; D - Notocorda curvada após GLY [1M]; E - Miogênese normal - Controle; F - Miogênese anormal com massa de celular disforme após MET [3M]. Vesícula ótica - Ot; Olho - E; Saco vitelínico - Ys; Ângulo lateral do corpo - Sab; Massa de celular anômala na cauda - Tm; Notocorda - No; Mioblastos - Cabeça de seta; Somitos - S; Miosepto - My; Yolk - Y e fibra muscular esquelética - Sf.

Figura 2.9 - Análise morfológica e histológica do rompimento da vesícula vitelina.



Fonte: Elaboração do próprio autor. A - Rompimento da camada sincicial de vitelo com escape do vitelo após M_2SO_4 [2M]; B - Rompimento da camada sincicial de vitelo com escape do vitelo após M_2SO_4 [2M]; C - Imagem controle da camada sincicial de vitelo; D - Micro dobra após PROP [5M]; E - Microfissura após PROP [2M]; F - Camada sincicial de vitelo anormal após M_2SO_4 [2M]. Rompimento da membrana - Brm; Vitelo - Y; Camada sincicial de gema -YSL; Núcleo normal - Nn; Epitélio - Ep; Micro dobras - Mf; Microfissura - Mfi; Núcleo Anormal - An.

Figura 2.10 - Análise morfológica e histológica de embriões sem forma.



Fonte: Elaboração do próprio autor. A - Massa deformada com corpo dividido após GLY [3M]; B - Massa deformada com corpo dividido após GLY [3M]; C - Olho após GLY [3M]; D - Vesícula ótica após GLY [3M]; E - Miogênese anormal após GLY [3M]; F - Miogênese anormal após GLY [3M]. Vesícula ótica - Ot; Olho - E; Saco vitelínico - Ys; Sulco neural - Ng; Mioblastos - Cabeça de seta; Somitos - S; Miosepto - My; Vitelo - Y; fibra muscular esquelética - Sf e Morte celular - Cd.

Discussão

A normatização dos parâmetros morfométricos embrionários são de extrema importância para a quantificação das deficiências morfológicas. Normalmente, poucos são os parâmetros disponíveis para avaliar os efeitos dos tratamentos químicos na criopreservação embrionária, sendo mais comum a “sobrevivência x morte” (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008) e anomalias morfológicas extremas (NEVES et al., 2012). Com a existência de uma padronização, pode-se quantificar os efeitos dos químicos de forma mais efetiva, separando variações de caracteres morfológicos que são normais à população e quais são realmente anormalidades, como por exemplo distinguir uma embrião pequeno de um “anão” por deficiência no processo miogênico.

Apesar de todos os danos morfológicos verificados, observa-se o contínuo desenvolvimento embrionário por um período de doze horas após a exposição aos crioprotetores. Mesmo nestes embriões anômalos, a quantidade de células integras foi considerável, contudo não o suficiente para a formação de uma unidade embrionária viável. Esse comportamento possivelmente ocorre pois nesta etapa de desenvolvimento a nutrição celular é realizada individualmente através da endocitose do vitelo, pela camada sincicial de vitelo com subsequente degradação enzimática e liberação dos nutrientes aos blastômeros (ARTICLE, 2000; WIEGAND, 1996) fornecendo elementos para as divisões celulares, contudo sem um controle efetivo do processo.

As classes das anomalias observadas são comuns tanto aos tratamentos químicos quanto ao controle, não sendo possível relacioná-las a um crioprotetor ou concentração de forma específica. Acredita-se, que essas injúrias sejam originadas pela alta osmolaridade das soluções e não somente pelas características químicas dos crioprotetores (DESAI; SPIKINGS; ZHANG, 2015; FAHY, 2010; LINDEN et al., 1999; ODA; GIBBONS; LEIBO, 1992), o que possivelmente explicaria a semelhança entre as injúrias nos distintos tratamentos aqui presentes.

Além dos fatores citados acima, o tempo de exposição aos crioprotetores é uma variável que influencia o desenvolvimento embrionário, podendo promover graves danos ao citoesqueleto e as fibras de actina quando essa exposição excede períodos de 5 minutos, ou mesmo levar a morte embrionária (HOTAMISLIGIL; TONER; POWERS, 1996; LOPES et al., 2014, 2011). Essas fibras são essenciais no desenvolvimento embrionário (KÖPPEN et al., 2006), sendo responsáveis pelos movimentos morfogenéticos, formação dos folhetos embrionários no estágio de gastrulação (KELLER; DAVIDSON; SHOOK,

2003; ROHDE; HEISENBERG, 2007; SOLNICA-KREZEL, 2006) e pelo fechamento do sulco neural através do encurtamento dos microtúbulos para a formação do tubo neural na fase de organogênese (MARTIN; WOOD, 2002). Assim, danos a essas estruturas podem ser responsáveis por algumas das anomalias presentes na blastoderme, e observadas neste trabalho, como a bipartição, descontinuidade dos mioseptos e desalinhamento dos mioblastos.

A falha nessa rede de actina também pode ser responsável pela fragilidade da camada sincicial de vitelo, que neste trabalho resultou em dobras, fissuras e até mesmo rompimento com escape de vitelo. Sabe-se que uma rede de actina também auxilia na conformação estrutural do polo vegetativo embrionário assim como formam anéis de actina que sustentam a YSL e a ancoram as células do blastoderme e a rede de actina no polo vegetativo (SOLNICA-KREZEL, 2006).

Durante o desenvolvimento precoce, os precursores dos eixos corporais dorsoventral e anteroposterior depende em grande parte dos genes maternos e zigóticos. O domínio genético POU2 foi descrito é relacionado como sendo importante na formação do encéfalo, iniciação da formação da endoderme e no estabelecimento do eixo dorsoventral (RAMEL; LEKVEN, 2004; SAÚDE et al., 2000). Alguns dos defeitos gerados pelos tratamentos com os crioprotetores como bipartição do blastoderme, curvaturas na notocorda, fusão de somitos e retração vitelínica, são também relatados no desenvolvimento dos peixes mutantes Mspg e MZspg (KHAN et al., 2012; REIM; BRAND, 2006). Juntamente ao relatado, sabe-se que a presença de crioprotetores pode levar a desnaturação proteica tanto pela associação de grupos específicos presentes nos químicos, como o grupo sulfidril no Me_2SO_4 (ARAKAWA; CROWET; KITA, 1990) ou pelo alto nível que radicais livres (DAVIES; LIN; PACIFICI, 1987). Assim, possivelmente os crioprotetores podem aumentar a incidência dessas anomalias relacionadas a esses genes, uma vez que os danos já estão presentes no controle.

Por fim, conclui-se ser possível padronizar as alterações morfológicas sofridas pelos embriões nos processos criogênicos, definindo onze faixas de normalidade para a espécie. As anormalidades comprovadas aqui não foram específicas ao crioprotetor ou a sua concentração; aumentando para o PROP, Me_2SO_4 , GLY e DMF sua frequência de ocorrência junto ao aumento da concentração. Após a exposição aos crioprotetores, os embriões ainda continuam seu desenvolvimento embrionário, por mais doze horas, desenvolvendo muitas vezes graves anormalidades como redução do tamanho corpóreo,

acefalia, retração vitelínica, bipartição da blastoderme, curvatura corpórea, crescimento de massa celular na musculatura e alta concentração de células mortas.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais - CEPTA / ICMBIO, que forneceu os peixes e as instalações utilizadas neste estudo e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, com o apoio financeiro (processo 2013/02588-5).

Bibliografia

ARAKAWA, T.; CROWET, J. H.; KITA, Y. A. The Basis for Toxicity of Certain Cryoprotectants : A Hypothesis. **Cryobiology**, v. 415, n. 1m, p. 401–415, 1990.

ARTICLE, R. Apolipoprotein E gene expression correlates with endogenous lipid nutrition and yolk syncytial layer lipoprotein synthesis during fish development. p. 251–261, 2000.

DAVIES, K. J. A.; LIN, S. W.; PACIFICI, R. E. Protein Damage and Degradation by Oxygen Radicals. p. 9914–9920, 1987.

DESAI, K.; SPIKINGS, E.; ZHANG, T. Use of methanol as cryoprotectant and its effect on sox genes and proteins in chilled zebrafish embryos. **Cryobiology**, v. 71, n. 1, p. 1–11, 2015.

ESPINOZA, C.; VALDIVIA, M.; DUPRÉ, E. Morphological alterations in cryopreserved spermatozoa of scallop *Argopecten purpuratus*. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 38, n. 1, p. 121–128, 2010.

FAHY, G. M. Cryobiology Cryoprotectant toxicity neutralization q , qq. **Cryobiology**, v. 60, p. 45–53, 2010.

GROENEVELD, L. F. et al. Genetic diversity in farm animals – a review. **Animal genetics**, v. 41, p. 6–31, 2010.

GUAN, M.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes using improved controlled slow cooling protocols. **Cryobiology**, v. 56, n. 3, p. 204–8, jun. 2008.

HAGEDORN, M. et al. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option. **Cryobiology**, v. 49, n. 2, p. 181–9, out. 2004.

HOTAMISLIGIL, S.; TONER, M.; POWERS, R. D. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. **Biology of reproduction**, v. 55, n. 1996, p. 161–168, 1996.

INOUE, B. D. et al. Vitrification of primordial germ cells using whole embryos for gene-banking in loach , *Misgurnus anguillicaudatus*. v. 28, p. 919–924, 2012.

KELLER, R.; DAVIDSON, L. A.; SHOOK, D. R. How we are shaped: The biomechanics of gastrulation. **Differentiation**, v. 71, n. 3, p. 171–205, 2003.

KHAN, A. et al. Mesendoderm specification depends on the function of Pou2 , the class V POU-type transcription factor , during zebrafish embryogenesis. 2012.

KÖPPEN, M. et al. Coordinated cell-shape changes control epithelial movement in zebrafish and *Drosophila*. v. 2681, p. 2671–2681, 2006.

LIN, C.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) blastomeres by controlled slow cooling. **Cryo letters**, v. 30, n. 2, p. 132–41, 2009.

LINDEN, A. VAN DER et al. Osmoregulation of the common carp (*Cyprinus carpio*) when exposed to an osmotic challenge assessed in-vivo and non-invasively by diffusion- and T 2 -weighted magnetic resonance imaging. v. i, p. 343–352, 1999.

LOPES, S. et al. Post-cooling damage to *Piaractus mesopotamicus* embryos at different stages of development Danos causados a embriões de *Piaractus mesopotamicus*, em diferentes estádios de desenvolvimento , após técnica de resfriamento. v. 2, p. 2–11, 2014.

LOPES, T. D. S. et al. Cooling of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos at various stages of development for 6 or 10 hours. **Theriogenology**, v. 75, n. 3, p. 570–6, fev. 2011.

MARTIN, P.; WOOD, W. Epithelial fusions in the embryo. **Elsevier Science**, v. 14, p. 569–574, 2002.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **The American journal of physiology**, v. 247, n. 3 Pt 1, p. C125–42, set. 1984.

NEVES, P. R. et al. Injuries in pacu embryos (*Piaractus mesopotamicus*) after freezing and thawing. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 22, n. 1, p. 25–31, fev. 2012.

NINHAUS-SILVEIRA, A. et al. Cryogenic preservation of embryos of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote (Cambridge, England)**, v. 17, n. 1, p. 45–55, 2008.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote (Cambridge, England)**, v. 14, n. 3, p. 217–29, ago. 2006.

NOTTOLA, S. A et al. Ultrastructure of human mature oocytes after slow cooling cryopreservation using different sucrose concentrations. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 22, n. 4, p. 1123–33, abr. 2007.

ODA, K.; GIBBONS, W. E.; LEIBO, S. P. Osmotic shock of fertilized. **Reproduction & fertility**, v. 95, p. 737–747, 1992.

OGONUKI, N. et al. Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved male germline stem cells. v. 18, n. 12, 2003.

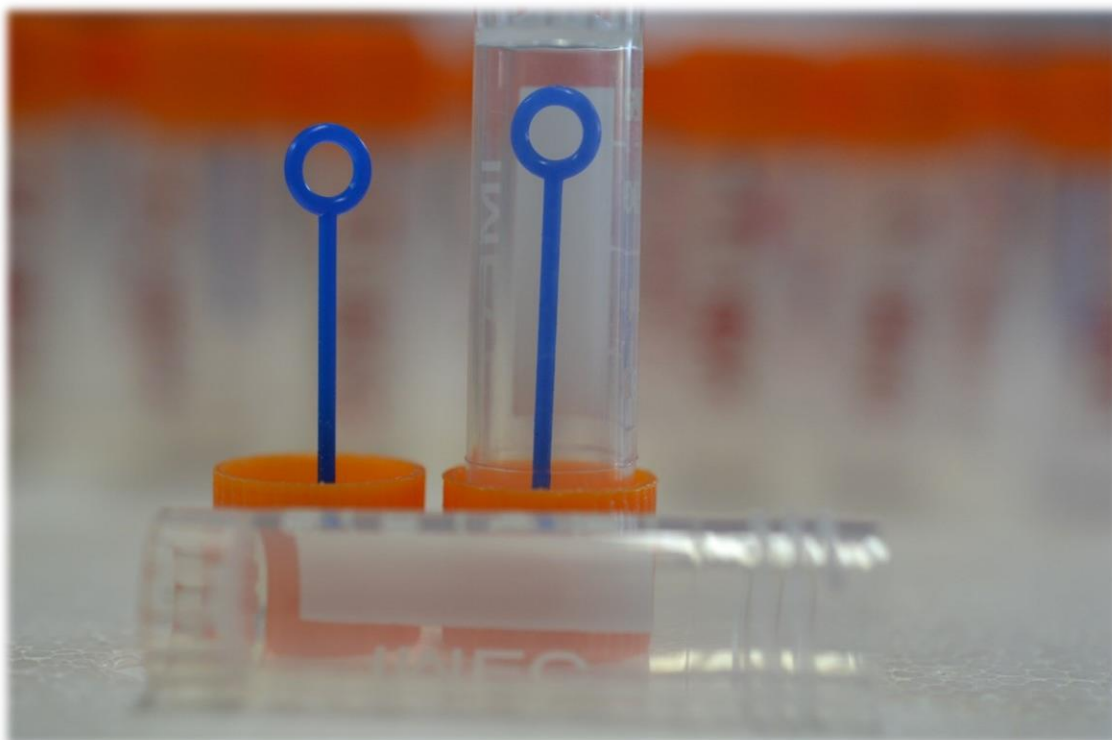
OLLIVIER, L. et al. An assessment of European pig diversity using molecular markers : Partitioning of diversity among breeds. **Conservation Genetics**, p. 729–741, 2005.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, p. 666, 1949.

- RAMEL, M.; LEKVEN, A. C. Repression of the vertebrate organizer by Wnt8 is mediated by Vent and Vox. p. 3991–4000, 2004.
- REIM, G.; BRAND, M. Maternal control of vertebrate dorsoventral axis formation and epiboly by the POU domain protein Spg / Pou2 / Oct4. v. 2770, p. 2757–2770, 2006.
- ROBLES, V. et al. Vitrification of turbot embryos: preliminary assays. **Cryobiology**, v. 47, n. 1, p. 30–39, ago. 2003.
- ROBLES, V. et al. Embryo cryopreservation: What we know until now. In: ELSA CABRITA, VANESA ROBLES, P. H. (Ed.). **Methods in reproductive aquaculture: Marine and Freshwater Species**. New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2009. p. 265–294.
- ROHDE, L. A.; HEISENBERG, C. P. Zebrafish Gastrulation: Cell Movements, Signals, and Mechanisms. **International Review of Cytology**, v. 261, n. 07, p. 159–192, 2007.
- RUBINSKY, B.; PEGG, D. E. A mathematical model for the freezing process in biological tissue. **Proceedings of the Royal Society of London.**, v. 234, n. 1276, p. 343–58, 23 ago. 1988.
- SAÚDE, L. et al. Axis-inducing activities and cell fates of the zebrafish organizer. v. 3417, p. 3407–3417, 2000.
- SHIVAJI, S. et al. Conservation of wild animals by assisted reproduction and molecular marker technology. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 4, n. July, p. 710–723, 2003.
- SOLNICA-KREZEL, L. **Gastrulation in zebrafish - all just about adhesion? Current Opinion in Genetics and Development**, 2006.
- SUZUKI, T. et al. Relation between Fish Embryos Toxicity of Cryoprotectant DMSO and Its Concentration in several Fish embryos. **Fisheries Science**, v. 61, n. 2, p. 193–197, 1995.
- VIVEIROS, A T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish physiology and biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 137–50, mar. 2009.
- WIEGAND, M. D. Composition , accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish. **Fish Biology and Fisheries** 6, v. 286, p. 259–286, 1996.
- YASHIRO, I. et al. High revivability of vitrified–warmed bovine mature oocytes after recovery culture with alfa -tocopherol. **Reproduction**, p. 347–355, 2015.
- YASUI, G. S. et al. A sperm cryopreservation protocol for the loach *Misgurnus anguillicaudatus* and its applicability for other related species. **Animal reproduction science**, v. 116, p. 335–345, 2009.
- YASUI, G. S. et al. Production of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) germ-line chimera using transplantation of primordial germ cells isolated from cryopreserved blastomeres. **Journal of animal science**, v. 89, n. 8, p. 2380–8, ago. 2011.
- ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Studies on Chilling Sensitivity of Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Embryos. **Cryobiology**, v. 32, p. 239–246, 1995.
- ZILLI, L.; VILELLA, S. Effect of Cryopreservation on Bio-Chemical Parameters , DNA Integrity , Protein Profile and Phosphorylation State of Proteins of Seawater Fish Spermatozoa. In: KATKOV, I. I. (Ed.). **Current Frontiers in Cryobiology**. [s.l.] InTech, 2012. p. 592.

CAPÍTULO 3

Vitrificação embrionária de *Prochilodus lineatus*
imerso em solução de 1,2-Propanediol.



Raphael da Silva Costa

**Vitrificação embrionária de *Prochilodus lineatus*
imerso em solução de 1,2-Propanediol.**

Raphael da Silva Costa ^{a,c}, Fabrício Marçal Silva de Souza ^a, José Augusto Senhorini ^b,
Cristiane Bashiyo-Silva^a, Rosicleire Verissimo Silveira ^a, Alexandre Ninhaus-Silveira ^{a*}.

^a Laboratório de Ictiologia Neotropical – LINEO, Depto de Biologia e Zootecnia, FEIS/UNESP –
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Avenue Brasil, 56, 15085-000, Ilha Solteira, São
Paulo, Brazil. Phone: +55 018 37431285, Fax: +55 018 37422140

^b Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais at Instituto Chico Mendes da
Conservação de Biodiversidade – CEPTA/ICMBio, Pirassununga, São Paulo, Brazil

^c Pós-Graduação em Biologia Animal, IBILCE/UNESP/Campus de São José do Rio Preto, São Paulo,
Brazil

* Corresponding author. Tel: +551837431285; Fax: +551837422140
E-mail address: ninhaus@bio.feis.unesp.br

Resumo

A criopreservação é uma técnica biotecnológica que com auxílio de soluções específicas preservam o material biológico por tempo indeterminado, permitindo manter a diversidade genética de animais domésticos e selvagens. Contudo até os dias de hoje, essa metodologia foi estabelecida apenas para espermatozoides e blastômeros. Assim objetiva-se neste trabalho promover a vitrificação de embriões de *Prochilodus lineatus*, no estágio de gastrulação, utilizando a solução de 1,2-Propanediol (Prop). Embriões de *Prochilodus lineatus* foram selecionados e submetidos a uma série de crioprotetores com osmolaridade crescente de Prop (1,5 – 3 – 6M); sendo no fim, imediatamente mergulhados no nitrogênio líquido e armazenados por 2 meses em botijões criogênicos (MVE, XC20). Após este período o material foi descongelado por imersão em água a temperatura de 30°C e à temperatura ambiente (27°C±1.2°C), esperando o descongelamento total da amostra. O sólido formado não apresentou regiões brancas, indicativo da nucleação cristais de gelo, constituindo um sólido vítreo. Contudo, não foi possível descongelar o material biológico sem promover a recristalização, não havendo sobrevivência embrionária. Foi comum encontrar nos embriões dobras na blastoderme, reduzindo sua interação com a camada sincicial de vitelo. Os espaços entre as células da blastoderme, apresentam-se dilatados em algumas regiões, provavelmente devido ao aumento do volume no processo de solidificação de líquidos. A região terminal da blastoderme se encontra totalmente desestruturada, não sendo possível, em muitos casos, observar sua união com a camada sincicial de vitelo. Esses dados auxiliam novos protocolos de criopreservação embrionária, tanto por identificar uma solução com baixa toxicidade e com grande capacidade de formação vítrea, quanto por descrever as principais anomalias geradas pelo protocolo e as regiões embrionárias de maior fragilidade.

Palavras-Chave Toxicidade, Crioprotetor, Criopreservação, Gástrula, Biotecnologia

Introdução

O *Prochilodus lineatus*, denominado de “Curimba” ou “Curimbatá” pertence à família Prochilodontidae (REIS; KULLANDER; FERRARIS-JR, 2003). Essa espécie, de grande importância ecológica e comercial, que se tornou um bom modelo para estudos com criopreservação de peixes neotropicais, por possuir um período reprodutivo que se estende de novembro a fevereiro, rápido desenvolvimento embrionário (NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006), produzir ovos pelágicos, não adesivos e com grande espaço perivitelino (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2007; SATO et al., 2005).

A criopreservação é uma técnica que teve seu primeiro sucesso descrito em 1949 com espermatozoides de coelho imersos em solução de glicerol (POLGE; SMITH; PARKES, 1949). Na aquicultura, essa metodologia iniciou seus estudos em 1953 buscando criopreservar espermatozoides e oócitos de *Clupea harengus* a -79°C (BLAXTER, 1953), também utilizando o glicerol. Até os dias de hoje, está biotecnologia para peixes é estabelecida apenas para espermatozoides (VIVEIROS; GODINHO, 2009; YASUI et al., 2009) e blastômeros (LIN et al., 2009; MARINA et al., 2002; STRUSSMANN et al., 1999; YASUI et al., 2011), mantendo-se inviável ainda para oócitos e embriões.

Em peixes, os embriões são complexos sistemas biológicos estruturados por diferentes compartimentos com osmolaridade específicas, resultando grandes barreiras a difusão de químicos durante o processo de crioconservação. Associado a isso, sua anatomia compõem um corpo de baixa relação área/volume, dificultando ainda mais essa metodologia (JARAMILLO et al., 2012; ROBLES et al., 2009).

Distintas são as metodologias de criopreservação descritas na literatura. Elas são compostas pela associação de curvas específicas de resfriamento (CHEN; TIAN, 2005; LOPES et al., 2013), temperatura de estoque e pela forma de exposição e concentração das soluções crioprotetoras (HAGEDORN et al., 1997; ZHANG; RAWSON, 1998; ZHANG et al., 2005); no entanto, todas possuem como objetivo comum, encontrar um equilíbrio entre as três variáveis citadas, reduzindo assim a nucleação de cristais de gelo e as injúrias promovidas pelas baixas temperaturas (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008).

Dentre as metodologias existente, a vitrificação é considerada por alguns autores a mais promissora para criopreservação embrionária (CHEN; TIAN, 2005; EL-DANASOURI; PH, 2005; KEIVANLO, 2013). Essa técnica utiliza acentuada redução de temperatura promovida pela imersão direta do material biológico no nitrogênio líquido, fazendo com que o sólido formado mantenha a estrutura molecular e a concentração iônica

da parte líquida, gerando uma estrutura vítrea (MEHL; BOUTRON, 1987), sem o desenvolvimento de grandes cristais de gelo (GUENTHER et al., 2006; SHAW; ORANRATNACHAI, 2000; MAZUR; PINN; KLEINHANS, 2007).

No entanto, a formação do sólido vítreo é a primeira etapa para preservar as características do material biológico. Após o período de armazenamento, para que ocorra a reconstituição da espécie, o material deve enfrentar o processo de desvitrificação existindo grande risco de que os cristais de gelo se reestremem, cresçam e inviabilizem o material criopreservado (CABRITA et al., 2003; MAZUR; PINN; KLEINHANS, 2007; PEGG, 2010). Esses cristais se formam primeiramente no entorno celular, em uma faixa de temperatura que varia de 0°C a -40°C, e ao tocar a membrana embrionária promovem a nucleação intracelular do gelo, sendo facilmente visualizado pelo aspecto esbranquiçado da região (HAGEDORN et al., 2004; PEGG, 2010; RUBINSKY; PEGG, 1988).

Assim objetiva-se neste trabalho promover a vitrificação de embriões de *Prochilodus lineatus*, no estágio de gastrulação, utilizando a solução de 1,2-Propanediol, e também descrever as principais anomalias, oriundas do protocolo utilizado, e as regiões embrionárias de maior fragilidade.

Material e métodos

Embriões

O manejo dos reprodutores e a obtenção dos embriões ocorreram conforme a descrição do capítulo 1.

Vitrificação

Embriões com características normais de desenvolvimento, foram selecionados e submetidos a uma série de 4 banhos de 5 minutos, por imersão em solução embrionária (12mM NaCl + 1mM KCl + 1,5 CaCl₂ + 1,5mM MgCl₂) contendo osmolaridade crescente de 1,2-Propanediol (0,75 - 1,5 - 3 - 6M); sendo no fim, imediatamente mergulhados no nitrogênio líquido. A seleção do químico crioprotetor foi baseada em testes prévios.

Para o armazenamento dos embriões durante a imersão em nitrogênio líquido, buscou-se criar, para este trabalho, um dispositivo que diminuísse a resistência à troca de calor entre o embrião e o nitrogênio. Assim, estruturou-se os “embryo’s cryotube” (Figuras 3.1 A-B), permitindo acondicionar, em uma alça calibrada e estéril de 10µl, confeccionada em poliestireno de alto impacto, um embrião e uma lâmina de solução crioprotetora (Figura 3.1 B), podendo ser posteriormente vitrificado ou congelado. Durante o processo de vitrificação, o movimento vigoroso para troca de calor foi realizado com o anel de 10µl orientado com seu maior eixo paralelo ao sentido do movimento, evitando desta forma que a resistência do fluido retirasse o embrião dos lócus de armazenamento (Figura 3.1 C). Cada embryo’s cryotube comportou apenas um embrião, fazendo com que todos nossos processos de vitrificação, fossem realizados individualmente.

Desvitrificação

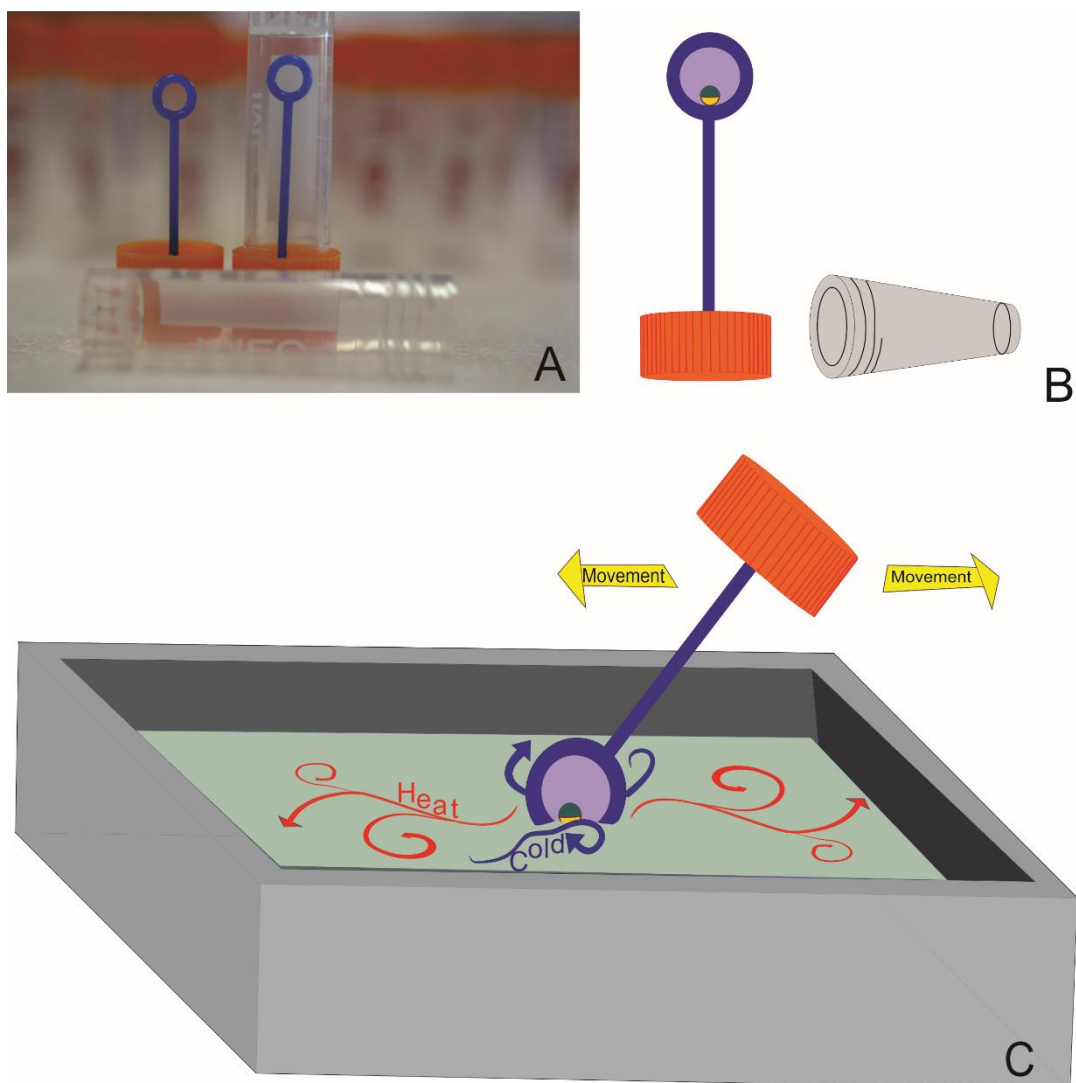
Após a vitrificação, os embriões foram depositados em botijão criogênico (MVE, XC20) e mantidos sob condições adequadas no Laboratório de Ictiologia Neotropical por um período de 2 meses.

Para a desvitrificação das amostras, utilizou-se dois tratamentos:

1º - Banhando o material vitrificado em água desclorificada, pH 7.4, oxigenação constante e temperatura de 30°C, mantendo-o até se desfazer o último cristal de gelo e o embrião se soltar do lócus do embryo’s cryotube.

2º - Expondo o material vitrificado à temperatura da sala (27°C±1.2°C), esperando o descongelamento total da amostra, sendo posteriormente mergulhado em água desclorificada a temperatura ambiente, pH 7.4 e com oxigenação constante.

Figura 3.1 - Embryo's cryotube.



Fonte: Elaboração do próprio autor. A – Foto do embryo's cryotube; B - Embryo's cryotube com 10 μ l de solução e um embrião; C - Sentido do movimento do Embryo's cryotube durante o processo de vitrificação.

Esteriomicroscopia

Os procedimentos para coloração e análises ocorreram conforme a descrição do capítulo 2.

Histologia.

Os procedimentos para fixação, microtomia e coloração ocorreram conforme a descrição do capítulo 2.

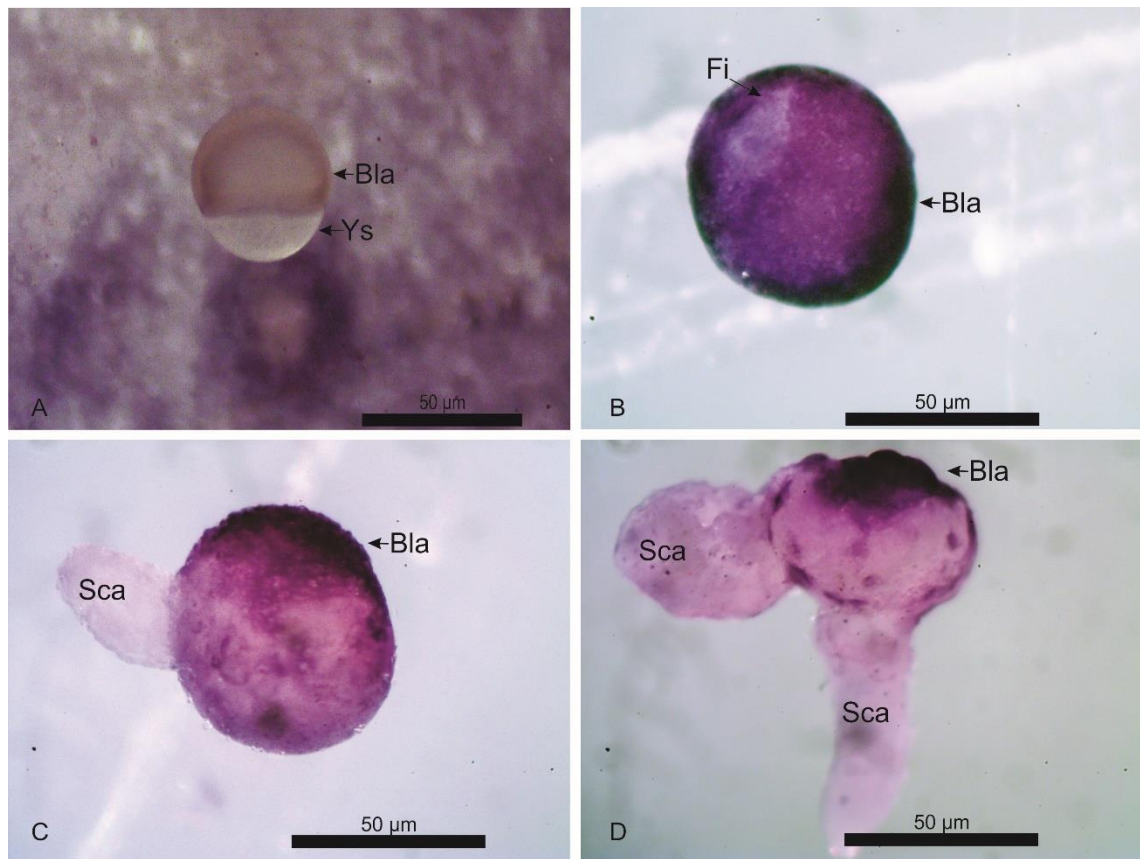
Resultados

No decorrer do processo de vitrificação embrionária, utilizando 1,2-Propanediol [6M], comprovou-se a formação de um sólido translúcido, sem qualquer região de coloração branca. Contudo, durante os protocolos de desvitrificação esse sólido translúcido tornou-se branco, iniciando sua alteração pela borda do locus até atingir o embrião. Não houve sobrevivência embrionária após as metodologias de vitrificação e desvitrificação aplicadas neste trabalho.

Ao comparar os embriões vitrificados com o controle (Figura 3.2 A), observa-se rupturas nos tecidos embrionários, tanto na blastoderme (Figura 3.2 B), quanto na vesícula vitelina (Figuras 3.2 C e D), sendo esta última, normalmente acompanhada pelo escapa de vitelo.

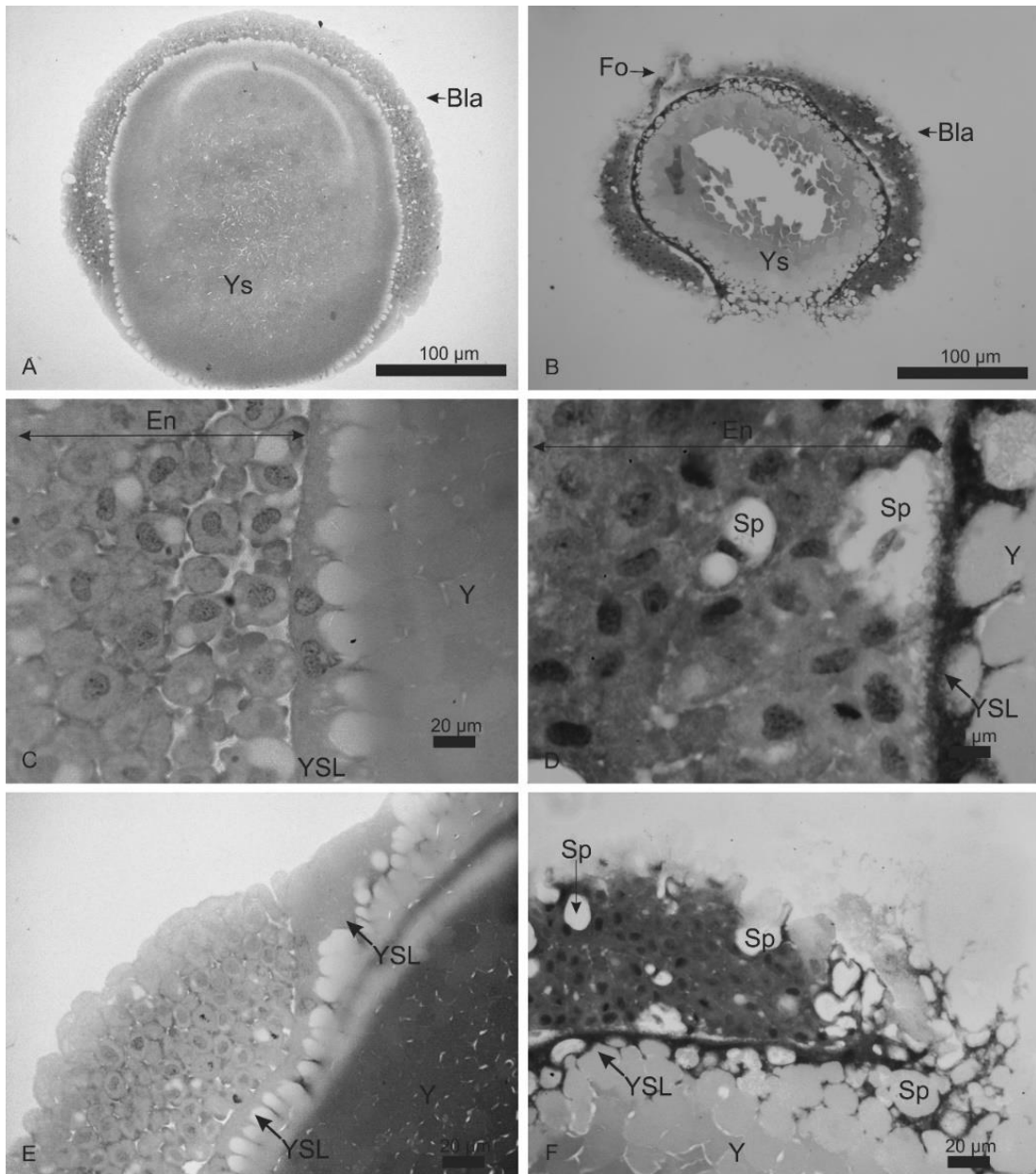
Histologicamente, nos embriões controle, observa-se uma uniformidade no blastoderme ao recobrir a vesícula vitelina (Figura 3.3 A). Ainda no controle, pode-se verificar a existência de pequenos espaços existentes entre as células da blastoderme (Figura 3.3 C) e uma forte união da região terminal da blastoderme com a camada sincicial de vitelo (Figura 3.3 E). Após o descongelamento embrionário, essa morfologia sofre graves alterações (Figura 3.3 B), resultando em uma blastoderme com dobras, perdendo assim sua interação com a camada sincicial de vitelo. Os espaços entre as células blastodérmicas passam a apresentar anômalos tamanhos (Figura 3.4 D), comuns também entre a camada sincicial de vitelo e a blastoderme. A região terminal da blastoderme se encontra totalmente desorganizada, não sendo possível em muitos casos observar sua união com a camada sincicial de vitelo (Figura 3.3 F).

Figura 3.2 - Embrião de *Prochilodus lineatus* vitrificado e aquecidos.



Fonte: Elaboração do próprio autor. A - Embrião controle no estágio de gastrulação; B - Rompimento da blastoderme; C e D - Rompimento da vesícula vitelina com escape de vitelo. Saco vitelínico - Ys; Blastoderme - Bla; Fissura - Fi; escape de vitelo - Sca. Escala 100 µm

Figura 3.3 - Efeitos do processo de vitrificação



Fonte: Elaboração do próprio autor. A, B e C – Embriões controle; B, D e F – Embriões vitrificados (1,2-Propanediol – 6M). A e B – Estágio de Gástrula (Fechamento do blastóporo); C e D – Endoderme. E e F – União entre a região terminal da blastoderme e a camada sincicial de vitelo. Saco vitelínico - Ys; Blastoderme – Bla; Endoderme – En; Vitelo – Y; Espaço intercelular – Sp; Camada sincicial de vitelo -YSL. Escala: A e B 100 μm; C – F 20 μm.

Discussão

A escolha do Prop 6M como exclusivo químico crioprotetor foi baseada em estudos prévios, que demonstraram uma baixa toxidez e uma ótima efetividade na formação de um sólido vítreo. O PROP, devido sua baixa toxidez, permitiu a utilização de embriões no estágio de gastrulação, mesmo sendo os estágios iniciais de desenvolvimento normalmente mais sensíveis aos químicos (LOPES et al., 2001; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008; VALDEZ et al., 2005).

Embriões no estágio de gástrula, se resistentes aos crioprotetores, tornam-se propícios para auxiliar a criopreservação. Acredita-se, que características morfológicas como: elevada área de superfície funcionando como área de difusão para os químicos, a baixa espessura de sua blastoderme permitindo uma difusão mais rápida dos químicos, a ausência de complexas estruturas internas diminuindo as diferenças nas taxas de osmolaridade, e a existência de espaços entre as células da blastoderme permitindo com mais facilidade o trânsito dos crioprotetores entre as células (SOLNICA-KREZEL, 2006; YIN; CIRUNA; SOLNICA-KREZEL, 2009; ZALIK et al., 1999), pode tanto facilitar a difusão dos crioprotetores no processo criogênico, quanto auxiliar futuros estudos de permeabilização através de técnicas como ultrassom (WARD; ROBERTSON, 1996) e campo elétrico (GUOQIANG et al., 2007).

A solução crioprotetora normalmente é composta por combinação de crioprotetores formando soluções de alta osmolaridade (LAHNSTEINER, 2008; VUTHIPHANDCHAI; PENGUN; NIMRAT, 2005). Essa associação tem como finalidade evitar a nucleação dos cristais de gelo reduzindo do ponto crioscópico da solução (PAULA et al., 2014; PEGG, 2010; WILSON; HENEGHAN; HAYMET, 2003), proteger os tecidos e membranas da nucleação dos cristais de gelo (GUENTHER et al., 2006; PEGG, 2010). Entretanto, deve-se considerar que cada crioprotetor possui um calor sensível e latente de fusão específicos, determinando o tempo necessário para realizar a completa solidificação de uma estrutura vítreo. Assim, ao associar neste trabalho outros crioprotetores ao Prop (COSTA et al. Cap. 2), obteve-se a formação de cristais de gelo, indicado pela formação de um sólido branco, que se acredita ser resultado de um novo equilíbrio térmico mais lento.

Esse sólido branco formado pela nucleação dos cristais de gelo não ocorre no processo de vitrificação (CHEN; TIAN, 2005). Essa técnica é descrita como a solidificação de um líquido não pela cristalização, mas pelo aumento de sua viscosidade durante a

redução de temperatura, criando um aspecto vítreo ao impedir todos os movimentos translacionais moleculares, marcando o fim do tempo biológico deste organismo (FAHY et al., 1984). Esta forma vítrea foi alcançada com intento neste trabalho utilizando apenas a solução de 1,2-Propanediol a 6M. Contudo, isso foi possível devido ao “embryo’s cryotube”, que permitiu armazenar os embriões em uma pequena quantidade de solução crioprotetora (10 μ l), facilitando ainda mais a troca de calor com o meio sem apresentar trincas nos sólidos.

No entanto, o grande problema dos protocolos avaliados foi a desvitrificação do material. Acredita-se que retornar o sólido vítreo ao seu estado líquido não seja possível com as metodologias aplicadas, pois a utilização de uma curva de aquecimento com baixa intensidade promove a formação e o crescimento dos cristais de gelo, fazendo com que o material vitrificado primeiramente se congele (alteração de sua estrutura sólida vítrea para cristalizada) e depois descongele, gerando danos semelhantes ao processo de congelamento.

Um ponto importante observado no fenômeno da recristalização, foi que o sólido formado possuía regiões com diferentes densidades de gelo, apresentando um dos efeitos da solução crioprotetora no processo de descongelamento. Essa conformação tem relação com a alteração do arranjo das moléculas de água no sólido formado devido a presença das substâncias crioprotetoras, que isolam as moléculas de água em agrupamentos, afastando-as das proteínas e membranas (KIRICHEK et al., 2016).

Contudo, os protocolos de vitrificação aqui testados não permitiram a sobrevivência embrionária, apesar das células embrionárias, em sua maioria, apresentarem morfologia normal. Os embriões no estágio de gástrula, apesar de não possuírem ainda os três folhetos embrionários ou órgãos, possuem um “mapa” das estruturas, que cada região de sua blastoderme irá originar, após os movimentos morfogenéticos (KELLER, 1975; KIMMEL et al., 1995). Assim, danos a regiões específicas como fissuras, promovidas pelo aumento do volume, espaços na blastoderme, resultado da cristalização de água intercelular, o rompimento de membranas pela nucleação de cristais de gelo extra ou intracelular ou a morte de um grupo de células inviabilizam sua sobrevivência. Outro fato é que ao sofrerem danos na camada sincicial de vitelo, principalmente a região de ligação com a região terminal da blastoderme, seus movimentos morfogenéticos se tornam deficientes, sendo

este local um dos pontos de forte ligação entre a blastoderme e a YSL através de fibras de actina.

Por fim, nossos estudos demonstram ser viável realizar a vitrificação dos embriões de *Prochilodus lineatus* utilizando o crioprotetor 1,2-Propanediol a 6M. Contudo, baixas taxas de aquecimento no descongelamento permitiu a formação e o crescimento de cristais de gelo, gerando danos que impedem o funcionamento do embrião como uma unidade biológica. Esses dados auxiliam novos protocolos de criopreservação embrionária, tanto por identificar uma solução com baixa toxidez e com grande capacidade de formação vítrea, quanto por descrever as principais anomalias geradas pelo protocolo e as regiões embrionárias de maior fragilidade.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais - CEPTA / ICMBIO, que forneceu os peixes e as instalações utilizadas neste estudo e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, com o apoio financeiro (Processo 2013/02588-5).

Bibliografia

BLAXTER, J. H. S. Sperm Storage and Cross-Fertilization of Spring and Autumn Spawning Herring. *Nature*, v. 172, p. 1189–1190, 1953.

CABRITA, E. et al. Dimethyl sulfoxide influx in turbot embryos exposed to a vitrification protocol. *Theriogenology*, v. 60, p. 463–473, 2003.

CHEN, S. L.; TIAN, Y. S. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. *Theriogenology*, v. 63, n. 4, p. 1207–19, 1 mar. 2005.

EL-DANASOURI, C. I.; PH, D. Vitrification versus conventional cryopreservation technique. *Middle East Fertility Society Journal*, v. 10, n. 3, p. 205–206, 2005.

FAHY, G. M. et al. Vitrification as an Approach to Cryopreservation. *Cryobiology*, p. 407–426, 1984.

GUENTHER, J. F. et al. Extra- and intra-cellular ice formation in Stage I and II *Xenopus laevis* oocytes. *Cryobiology*, v. 52, n. 3, p. 401–16, jun. 2006.

- GUOQIANG, J. et al. Transdermal Drug Delivery by Electroporation : The Effects of Surfactants on Pathway Lifetime and Drug Transport. **Chin. J. Chem. Eng.**, v. 15, n. 20376038, p. 397–402, 2007.
- HAGEDORN, M. et al. Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. **Cryobiology**, v. 34, n. 3, p. 251–63, maio 1997.
- HAGEDORN, M. et al. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option. **Cryobiology**, v. 49, n. 2, p. 181–9, out. 2004.
- JARAMILLO, R. et al. Caracterización electroforética de las proteínas del corion normal Electrophoretic characterization for both normal and hard chorion proteins of *Salmo salar*. **medicina veterinaria**, v. 65, p. 59–65, 2012.
- KEIVANLO, S. Feasibility Studies on Vitrification of Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) Embryos. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v. 04, n. 03, p. 3–5, 2013.
- KELLER, R. E. Vital Dye Mapping of the Gastrula *Xenopus laevis* and Neurula of *Xenopus laevis*. **DEVELOPMENTAL BIOLOGY** 42, v. 42, p. 222–241, 1975.
- KIMMEL, C. B. et al. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. v. 10, 1995.
- KIRICHEK, O. et al. Segregated water observed in a putative fish embryo cryopreservative Subject Category: Subject Areas : **Royal Society**, p. 1–9, 2016.
- LAHNSTEINER, F. The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, v. 69, n. 3, p. 384–396, 2008.
- LIN, C. et al. Effect of chilling and cryopreservation on expression of Pax genes in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and blastomeres. **Cryobiology**, v. 59, n. 1, p. 42–7, ago. 2009.
- LOPES, T. D. S. et al. Chilling curves for *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) embryos stored at -8°C. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 21, n. 4, p. 345–50, nov. 2013.
- Lopes, T.D.S., et al. Cooling of pacu (*Piaractus mesopotâmicus*) embryos at various stages of development for 6 or 10 hours. **Theriogenology** v.75, pg 570–6, 2011.
- MARINA, P. et al. Fine structure of leydig and sertoli cells in the testis of immature and mature spotted ray *Torpedo marmorata*. **Molecular reproduction and development**, v. 63, n. 2, p. 192–201, out. 2002.
- MAZUR, P.; PINN, I. L.; KLEINHANS, F. W. The temperature of intracellular ice formation in mouse oocytes vs . the unfrozen fraction at that temperature q. v. 54, p. 223–233, 2007.
- MEHL, P.; BOUTRON, P. Glass-forming tendency and stability of the amorphous state in the aqueous solutions of linear polyalcohols with four carbons. II. Ternary systems with water, 1,2-propanediol or 1,3-butanediol or 2,3-butanediol. **Cryobiology**, v. 24, n. 4, p. 355–367, 1987.
- NINHAUS-SILVEIRA, A. et al. Structural and ultrastructural characteristics of the yolk syncytial layer in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Teleostei; Prochilodontidae). **Zygote (Cambridge, England)**, v. 15, n. 3, p. 267–71, ago. 2007.
- NINHAUS-SILVEIRA, A. et al. Cryogenic preservation of embryos of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote (Cambridge, England)**, v. 17, n. 1, p. 45–55, 2008.
- NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote (Cambridge, England)**, v. 14, n. 3, p. 217–29, ago. 2006.

PAULA, D. A. J. et al. Toxicity of cryoprotectants on *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837) (curimba) embryos in an experimental incubator (Characiformes: Prochilodontidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 12, n. 4, p. 835–844, 2014.

PEGG, D. E. Cryobiology The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs q. v. 60, p. 36–44, 2010.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, p. 666, 1949.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS-JR, C. J. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.

ROBLES, V. et al. Embryo cryopreservation: What we know until now. In: ELSA CABRITA, VANESA ROBLES, P. H. (Ed.). **Methods in reproductive aquaculture: Marine and Freshwater Species**. New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2009. p. 265–294.

RUBINSKY, B.; PEGG, D. E. A mathematical model for the freezing process in biological tissue. **Proceedings of the Royal Society of London.**, v. 234, n. 1276, p. 343–58, 23 ago. 1988.

SATO, Y. et al. Influence of the Abaeté River on the reproductive success of the neotropical migratory teleost *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam, southeastern Brazil. **River Research and Applications**, v. 21, n. 8, p. 939–950, out. 2005.

SHAW, J. M., A. ORANRATNACHAI, A. O. T. FUNDAMENTAL CRYOBIOLOGY OF oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, n. 99, p. 59–72, 2000.

SOLNICA-KREZEL, L. **Gastrulation in zebrafish - all just about adhesion? Current Opinion in Genetics and Development**, 2006.

STRUSSMANN, C. et al. Cryopreservation of isolated fish blastomeres: effects of cell stage, cryoprotectant concentration, and cooling rate on postthawing survival. **Cryobiology**, v. 39, n. 3, p. 252–61, nov. 1999.

VALDEZ, D. M. et al. Sensitivity to chilling of medaka (*Oryzias latipes*) embryos at various developmental stages. **Theriogenology**, v. 64, n. 1, p. 112–22, 1 jul. 2005.

VIVEIROS, A T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish physiology and biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 137–50, mar. 2009.

VUTHIPHANDCHAI, V.; PENGUN, B.; NIMRAT, S. Effects of cryoprotectant toxicity and temperature sensitivity on the embryos of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture**, v. 246, n. 1-4, p. 275–284, maio 2005.

WARD, A. R.; ROBERTSON, V. J. Dosage Factors for the Subaqueous Application Ultrasound. v. 77, n. November, p. 1167–1172, 1996.

WILSON, P. .; HENEGHAN, A. .; HAYMET, A. D. . Ice nucleation in nature: supercooling point (SCP) measurements and the role of heterogeneous nucleation. **Cryobiology**, v. 46, n. 1, p. 88–98, fev. 2003.

YASUI, G. S. et al. A sperm cryopreservation protocol for the loach *Misgurnus anguillicaudatus* and its applicability for other related species. **Animal reproduction science**, v. 116, p. 335–345, 2009.

YASUI, G. S. et al. Production of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) germ-line chimera using transplantation of primordial germ cells isolated from cryopreserved blastomeres. **Journal of animal science**, v. 89, n. 8, p. 2380–8, ago. 2011.

YIN, C.; CIRUNA, B.; SOLNICA-KREZEL, L. **Chapter 7 Convergence and Extension Movements During Vertebrate Gastrulation**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. v. 89

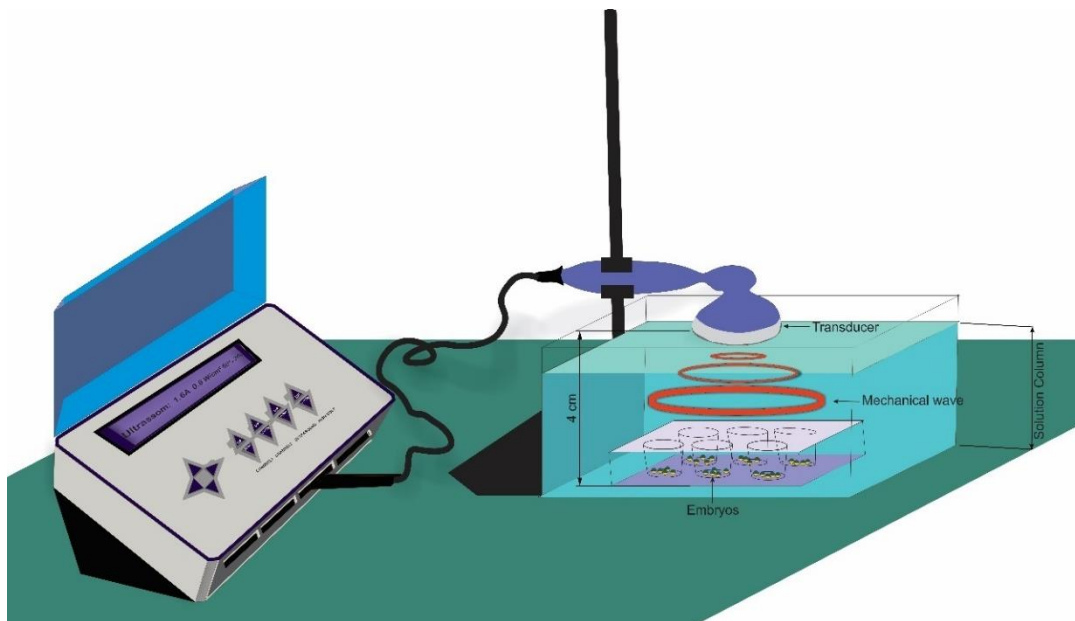
ZALIK, S. E. et al. Cell adhesion and the actin cytoskeleton of the enveloping layer in the zebrafish embryo during epiboly. **Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire**, v. 77, p. 527–542, 1999.

ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Permeability of dechorionated one-cell and six-somite stage zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos to water and methanol. **Cryobiology**, v. 37, n. 1, p. 13–21, ago. 1998.

ZHANG, Y. Z. et al. Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. **Theriogenology**, v. 63, n. 3, p. 763–73, fev. 2005.

CAPÍTULO 4

Efeitos do campo ultra-sônico sobre o desenvolvimento embrionário de *Prochilodus lineatus*.



Raphael da Silva Costa

Efeitos do campo ultra-sônico sobre o desenvolvimento embrionário de *Prochilodus lineatus*.

Raphael da Silva Costa ^{a,c}, Fabrício Marçal Silva de Souza ^a, José Augusto Senhorini ^b, Cristiane Bashiyo-Silva^a, Geovanna Carla Zacheo Coelho^a, Rosicleire Verissimo Silveira ^a, Alexandre Ninhaus-Silveira ^{a*}.

^a Laboratório de Ictiologia Neotropical – LINEO, Depto de Biologia e Zootecnia, FEIS/UNESP – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Avenue Brasil, 56, 15085-000, Ilha Solteira, São Paulo, Brazil. Phone: +55 018 37431285, Fax: +55 018 37422140

^b Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais at Instituto Chico Mendes da Conservação de Biodiversidade – CEPTA/ICMBio, Pirassununga, São Paulo, Brazil

^c Pós-Graduação em Biologia Animal, IBILCE/UNESP/Campus de São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

* Corresponding author. Tel: +551837431285; Fax: +551837422140
E-mail address: ninhaus@bio.feis.unesp.br

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do campo pulsado de ultrassom (1Mhz), sobre desenvolvimento de embriões de *Prochilodus lineatus*, identificando uma densidade energética máxima suportada. Embriões no estágio de gastrulação foram submetidos a oito campos acústicos gerados pelo “Sonopulse II” (T1 – T8), ao variar o tempo, intensidade, frequência e duty (porcentagem do pulso o campo está sendo gerado), sendo calculado a densidade energética fornecida, corrigida pelo índice de dispersão energética. A frequência de 16Hz possibilitou uma sobrevivência superior a 50%, demonstrando grande resistência a intensidades até 1,12 W/cm². Apesar dos tratamentos T6 e T7 apresentaram densidade energética semelhante (1,1W/cm²), a sobrevivência em T6 foi superior devido a intensidade transmitida a cada pulso ser a metade da transmitida em T7. Uma parcela embrionária foi fixada em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2% logo após os tratamentos, e outra alíquota, 12 horas após os tratamentos. Posteriormente, os embriões foram impregnados por metacrilato glicol, microtomizados 3 µm e corados com Hematoxilina-eosina. As análises estatísticas foram realizadas através do software “R Development Core Team” aplicando-se os testes de Bartlett, Shapiro-Wilk e Kruskal Wallis. As injúrias encontradas nas frequências de 16 e 48Hz foram semelhantes, sendo comum observar o rompimento da coesão tecidual entre a blastoderme e a camada sincicial de vitelo (YSL), fissuras entre os blastômeros e o desprendimento da camada de envelope (EVL). Após doze horas de desenvolvimento, observou-se três categorias de anomalias: corpo curvado, alteração no comprimento embrionário e formação de uma massa celular disforme. Assim, a utilização dos campos ultrassônicos (1Mhz) para embriões de *Prochilodus lineatus* é viável utilizando pulsos de 16Hz com uma densidade energética total até 1,12W/cm², mantendo a energia transmitida por pulso inferior a 3,9 10⁻⁴ W/cm², evitando altos índices de alterações morfofisiológicas e mortalidade. Estes resultados podem auxiliar o desenvolvimento de protocolos biotecnológicos, que busquem aumentar a permeabilidade das membranas embrionárias a proteínas, medicamentos e crioprotetores.

Palavras Chave: Ultrassom, membranas, biotecnologia, gastrulação, embrião.

Introdução

A criopreservação de embriões e oócitos de peixes e anfíbios se tornou um grande obstáculo dentro da biotecnologia da criopreservação (STREIT-JR et al., 2014; UTESHEV et al., 2006; ZHANG et al., 2005). Desde o primeiro protocolo descrito para espermatozoide de coelho (POLGE; SMITH; PARKES, 1949), inúmeras tentativas vêm buscando a preservação do material genético materno (oócitos ou embriões), enfrentando infindáveis barreiras e resultados negativos (MASSIP, 2001; ROBLES et al., 2003; SANCHES et al., 2014; STREIT-JR et al., 2014), mantendo está técnica aplicável apenas ao material genético dos machos, congelando os espermatozoides (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006a; YASUI et al., 2009), sendo ainda necessário dos oócitos do espécime in natura ou a utilização de técnicas de hibridização para reconstituir parte da bagagem genética.

A dificuldade para desenvolvimento da técnica se deve a própria constituição embrionária. Embriões de peixes são complexos sistemas biológicos formados por diferentes compartimentos, como um grande vitelo delimitado por um sincício celular (camada sincicial de vitelo), um compartimento celular (blastoderme ou embrião em desenvolvimento), sendo tudo rodeado por um espaço perivitelino delimitado pela membrana coriônica (JARAMILLO et al., 2012; NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006b; ROBLES et al., 2009). Esses compartimentos formam grandes barreiras durante os processos de crioconservação, caracterizando uma baixa relação entre a área e o volume e diferentes taxas de osmolaridade que dificultam o efluxo e influxo de água e crioprotetores (HAGEDORN et al., 2004; HARVEY; KELLEY; ASHWOOD-SMITH, 1983; MULDREW; MCGANN, 1990; RAWSON et al., 2000; ROBLES et al., 2009). Desta forma, a criopreservação exige novas abordagens que resultem em novas possibilidades para o congelamento.

O ultrassom é uma técnica que permite o aumento da permeabilidade dos tecidos biológicos, sendo a muito empregado nas áreas médicas e fisioterápicas (sonoforese) (BAKER; ROBERTSON; DUCK, 2001; SPEED, 2001) como metodologia para aumentar a permeabilidade das membranas celulares aos medicamentos (BOUCAUD et al., 2002; JOHNS, 2002; WANG et al., 2008).

Essa técnica é uma modalidade de energia sonora longitudinal, de penetração profunda, que, ao ser transmitida aos tecidos biológicos, é capaz de produzir alterações celulares por efeitos mecânicos (KRASOVITSKI et al., 2011). As ondas de ultrassom são

originadas por um cristal piezoelétrico que ao receber descargas elétricas (BAKER; ROBERTSON; DUCK, 2001), modificam suas dimensões promovendo a expansão e compressão da matéria no seu entorno, resultando na vibração molecular. Sequências destes ciclos na ordem de mega-hertz formam ondas mecânicas que transmitem sua energia através do meio (KRASOVITSKI et al., 2011; KUMARESAN et al., 2011; MARTINEZ et al., 2011; MITRAGOTRI; KOST, 2004). Contudo, alguns meios de propagação, incluindo a água, pode promover acentuada redução da energia transmitida aos tecidos (WARD; ROBERTSON, 1996).

Desta forma, encontrar primeiramente os níveis máximos de ultrassom suportados pelos embriões de *Prochilodus lineatus* possibilita associar essa técnica a outras metodologias biotecnológicas, que busquem aumentar a permeabilidade das membranas embrionárias de peixes a determinados químicos, possibilitando a difusão de medicamentos, crioprotetores, marcadores e auxiliando na dissociação dos tecidos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do campo pulsado de ultrassom (1Mhz), sobre desenvolvimento de embriões de *Prochilodus lineatus*, buscando identificar uma densidade energética máxima suportada pela espécie visando futuros tratamentos para o aumento da permeabilidade embrionária.

Material e métodos

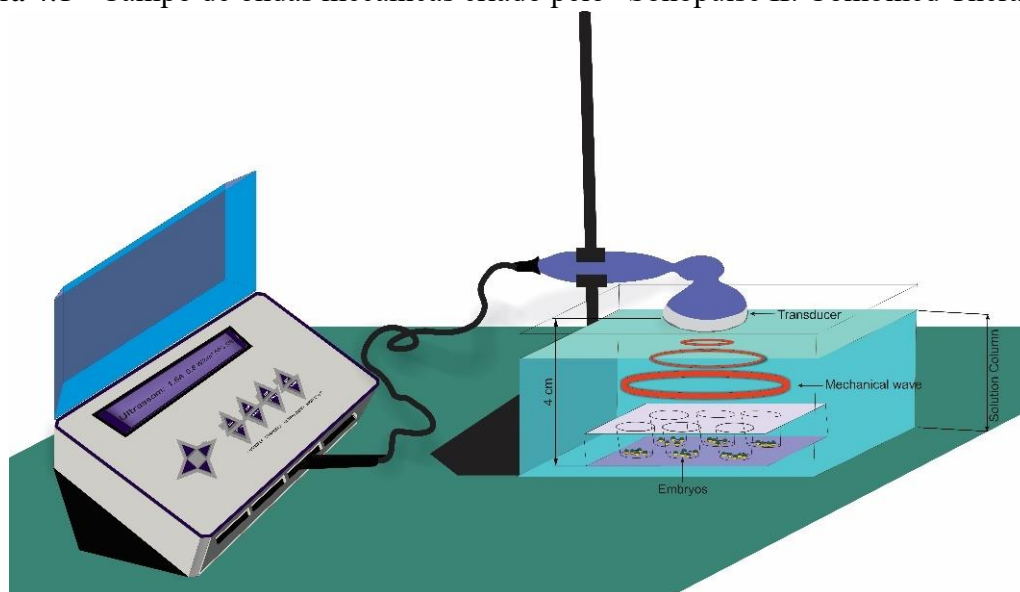
Embriões

O manejo dos reprodutores e a obtenção dos embriões ocorreram conforme a descrição do capítulo 1.

Ultrassom

Após selecionados, os embriões foram dispostos em placas de cultura com seis poços de armazenamento e uma área total de 100,5cm². Durante os tratamentos, o conjunto “placa + embriões” era depositado em uma câmara contendo uma coluna de solução embrionária (12mM NaCl + 1mM KCL + 1,5 CaCl₂ + 1,5mM MgCl₂) contendo, aproximadamente, 6cm de altura (Figura 4.1).

Figura 4.1 - Campo de ondas mecânicas criado pelo “Sonopulse II: Combined Therapy”.



Fonte: Elaboração do próprio autor. O aparelho possui um transdutor com área igual a 10cm² disposto a uma distância de 4cm dos embriões.

Para gerar o campo de ondas mecânicas (ultrassom) utilizou-se o “Sonopulse II: Combined Therapy” produzido pela Ibramed (ANVISA Nº: 10360310025). O aparelho possui um transdutor com área igual a 10cm² e uma potência variando de 0,2 a 20W/cm. Sua frequência foi fixada em 1MHZ, sendo aplicado a uma distância de 4cm dos embriões, padronizando a quantidade de energia dissipada (WARD; ROBERTSON, 1996).

Os embriões foram expostos a oito tratamentos variando o Tempo (sec), intensidade (w/cm²) e duty (porcentagem do período de uma onda quadrática em que pulso está sendo gerado [20% = 0.2 ou 50% = 0.5]) (Tabela 4.1), possibilitando calcular a energia temporal disponibilizada ao embrião (Equação 1) e a quantidade de energia transmitida por pulso em cada tratamento (Equação 2). Cada tratamento foi realizado utilizando duas frequências de pulsos 16 e 48 Hz.

Tabela 4.1 - Parâmetros dos campos de Ultrassom T1-T8 - Tratamentos; Duty - Porcentagem do período, de uma onda quadrática, em que o pulso está sendo gerado (0,2 ou 0,5); I - Classificação de intensidade (W / cm²) e Ti - Tempo de tratamento (Sec.).

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Duty	0.2	0.2	0.2	0.5	0.2	0.5	0.5	0.5
I	0.8	0.8	1.6	0.8	1.6	0.8	1.6	1.6
Ti	30	60	60	30	60	60	30	60

Fonte: Elaboração do próprio autor.

Equação 1 - Densidade de energia. F (ε) - Energia acumulada (J/cm²); I - Índice de intensidade (W/cm²); Sp - Distância do transdutor para o embrião (cm); Tr - Área de transdutor (cm²); Duty - Porcentagem do período, de uma onda quadrática, em que o pulso está sendo gerado (0,2 ou 0,5); Tf - Campo de tratamento (cm²); Ti - Tempo de tratamento (seg.). Cálculo da densidade de energia acumulada modificada (Baker et al., 2001). Em negrito temos o fator de correção devido à dispersão de energia devido à distância. (WARD; ROBERTSON, 1996).

$$f(\epsilon) = \left\{ \frac{\left[\frac{I \left(\frac{W}{cm^2} \right)}{1.02 + (0.27 \times Sp)} \right] \times Tr (cm^2) \times Ti(sec)}{Tf (cm^2)} \right\} \times Duty$$

Equação 2: Energia transmitida a cada pulso: ρ = Energia (J/cm²); f(ε)= energia acumulada (W/cm²); Ti = tempo de tratamento (segundos); Fp = frequência de pulso (Hz).

$$\rho = \frac{f(\epsilon)}{Ti(s) \times Fp (Hz)}$$

Após a exposição ao ultrassom, uma alíquota embrionária foi fixada para análises morfométricas e estereológicas futuras, enquanto os embriões dos outros 5 poços, foram acomodados em incubadoras experimentais e levadas para desenvolver por um período de 12 horas a uma temperatura de 28°C ± 1°C.

Por fim, foram acondicionados em tanques de fluxo contínuo por um período de doze horas, sendo por fim fixados em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2%.

Estereomicroscopia

Os procedimentos para coloração e análises ocorreram conforme a descrição do capítulo 2.

Histologia

Os procedimentos para fixação, microtomia e coloração ocorreram conforme a descrição do capítulo 2.

Análise estatística

Todos os tratamentos foram realizados inteiramente ao acaso e avaliados utilizando o software “R Development Core Team (2010)”. Os testes contaram com cinco repetições contendo $52 \pm 4,0$ embriões cada. Aplicou-se os testes de Bartlett, Shapiro-Wilk e Kruskal Wallis.

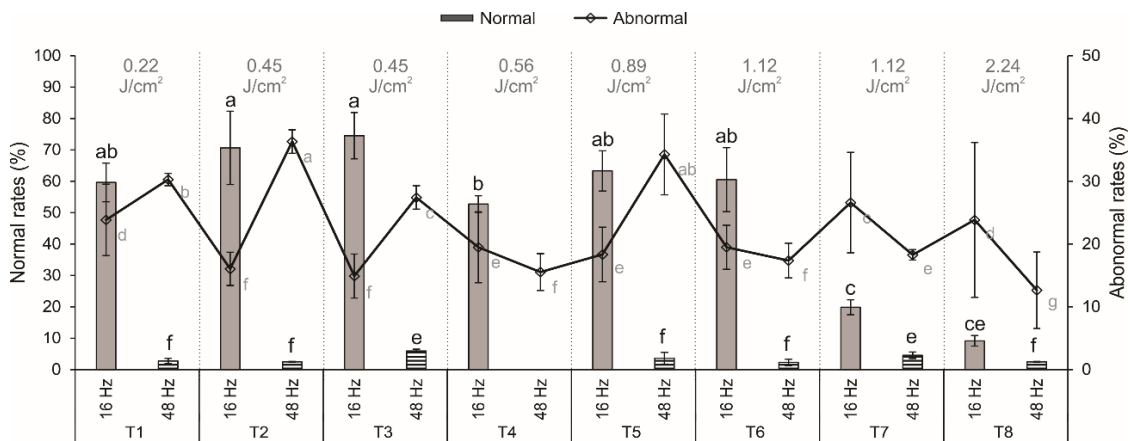
Resultados

Dentre as frequências de pulsos, apenas 16Hz possibilitou uma sobrevivência embrionária acima de 50% (Figura 4.2). Em 48Hz, quantificou-se taxas abaixo de 36.3 ± 0.35 % em todos os tratamentos, sendo ainda observado, nesta frequência, uma intensa formação de instáveis microbolhas na solução.

Os embriões de *Prochilodus lineatus* apresentaram grande resistência aos campos de ultrassom enquanto à energia temporal disponibilizada ficou igual ou inferior a $1,12 \text{ W/cm}^2$, resultando em taxas de sobrevivência acima de $52,75 \pm 5,9\%$ na frequência de 16Hz (Figura 4.2). Contudo, apesar de T6 e T7 possuírem uma densidade energética semelhante

(1,12W/cm²), suas taxas de sobrevivência foram distintas 60,5 ± 10,1% e 19,87 ± 2,3 %, respectivamente (Figura 4.2).

Figura 4.2 - Sobrevivência relativa dos embriões de *Prochilodus lineatus* após exposição aos campos de ultrassom.



Fonte: Elaboração do próprio autor. T1-T8 - Tratamentos de ultrassom; 16 e 48Hz - Frequência de pulso (Hertz); 20%, 50% - Duty (fator de trabalho); 0,8A, 1,6A- Corrente elétrica fornecida ao transdutor; Seg - Tempo de tratamento (segundos). Normal - Embriões com morfologia normal 12 horas após o tratamento. Anormal - Embriões com morfologia alterada 12 horas após o tratamento. Todas as amostras continham 52 ± 4,0 embriões. Os dados são apresentados como a percentagem média em relação ao controle ± desvio padrão (considerando o controle como 100%). As letras minúsculas comparam estatisticamente as taxas de sobrevivência (bar) ou as taxas anormais (linha).

Avaliando esta equivalência energética, comprovou-se que, ao quantificar a energia transmitida a cada pulso, T7 forneceu o dobro de energia do que T6 (Tabela 4.2). De forma similar, o tratamento T4 apesar de possuir uma densidade energética (0,56 J/cm²) inferior a T5 (0,89 J/cm²), possui sua $f(\epsilon/p)$ maior (1,2 10⁻³ J/cm²) e novamente uma sobrevivência inferior.

Em sua morfologia normal (Figuras 4.3 A–C), os embriões de *P. lineatus* apresentam uma uniformidade em seu blastoderme, sem dobras ou fissuras (Figura 4.3 A). Sua YSL encontra-se justaposta ao hipoblasto, camada celular que intercala blastômeros e reduzidos espaços (Figura 4.3 B). Na periferia do blastodisco, encontra-se um espessamento externo da YSL que se liga aos extremos do blastoderme, composta pelos blastômeros e camada de envelope EVL (Figura 4.3 C).

Tabela 4.2- Energia transmitida pelo ultrassom. T1-T8 - Tratamentos de ultrassom; Densidade de energia- f (ϵ) (W / cm²); Densidade de energia por pulso de 16hz- f ($\epsilon / 16$); Densidade de energia por pulso de 48hz- f ($\epsilon / 48$).

Tratamentos de Ultrassom								
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
$f(\epsilon)$	0.22	0.45	0.45	0.56	0.89	1.12	1.12	2.24
$f(\epsilon/16)$	$5 \cdot 10^{-4}$	$4,6 \cdot 10^{-4}$	$9 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^{-3}$	$9 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^{-3}$	$2,3 \cdot 10^{-3}$	$2,3 \cdot 10^{-3}$
$f(\epsilon/48)$	$1,6 \cdot 10^{-4}$	$1,6 \cdot 10^{-4}$	$3,1 \cdot 10^{-4}$	$3,9 \cdot 10^{-4}$	$3,1 \cdot 10^{-4}$	$3,9 \cdot 10^{-4}$	$7,8 \cdot 10^{-4}$	$7,8 \cdot 10^{-4}$

Fonte: Elaboração do próprio autor.

Após a administração dos campos de ultrassom, comprovou-se que parte das mortes são promovidas por alterações na estrutura dos embriões.

Imediatamente após os tratamentos, as injúrias encontradas nas frequências de 16 e 48Hz foram semelhantes, sendo comum observar o rompimento da coesão tecidual entre a blastoderme e YSL (Figuras 4.3 D e E), e em casos mais extremos o rompimento do blastoderme, surgindo fissuras entre os blastômeros e o desprendimento da EVL do blastodisco (Figura 4.3 F).

Entretanto, para os embriões que resistiram aos campos mecânicos, se desenvolveram por mais doze horas, quantificou-se taxas de anormalidades morfológicas estatisticamente semelhantes, ou com baixa variação, quando avaliamos dentro da mesma faixa de frequência (16 ou 48Hz). Contudo, ao se comparar, dentro do mesmo tratamento (nível energético-Joules) as frequências 16 e 48Hz, observa-se uma taxa normalmente superior nas frequências de 48Hz (Figura 4.4).

Doze horas após o termino dos tratamentos, os embriões já possuíam estruturas como placode olfatório, olhos, vesícula ótica, nadadeira embrionária bem delineada e um corpo linear com saco vitelino bem pronunciado (Figura 4.5 A). Contudo, apesar da sobrevivência embrionária, nas frequências de 16Hz, se manter acima de 50% até T6, três classes de anomalias foram comuns, Bend Body (Figura 4.5 B), Size altered Body (Figura 4.5 C) e Cell mass deformed (Figura 4.5 D), sendo estas também presentes ao controle. Observa-se que com a frequência de 16Hz, as classes de anomalias se mantiveram estatisticamente constante até a densidade energética por pulso atingir $2.3 \cdot 10^{-3}$ J/cm², aumentando a partir

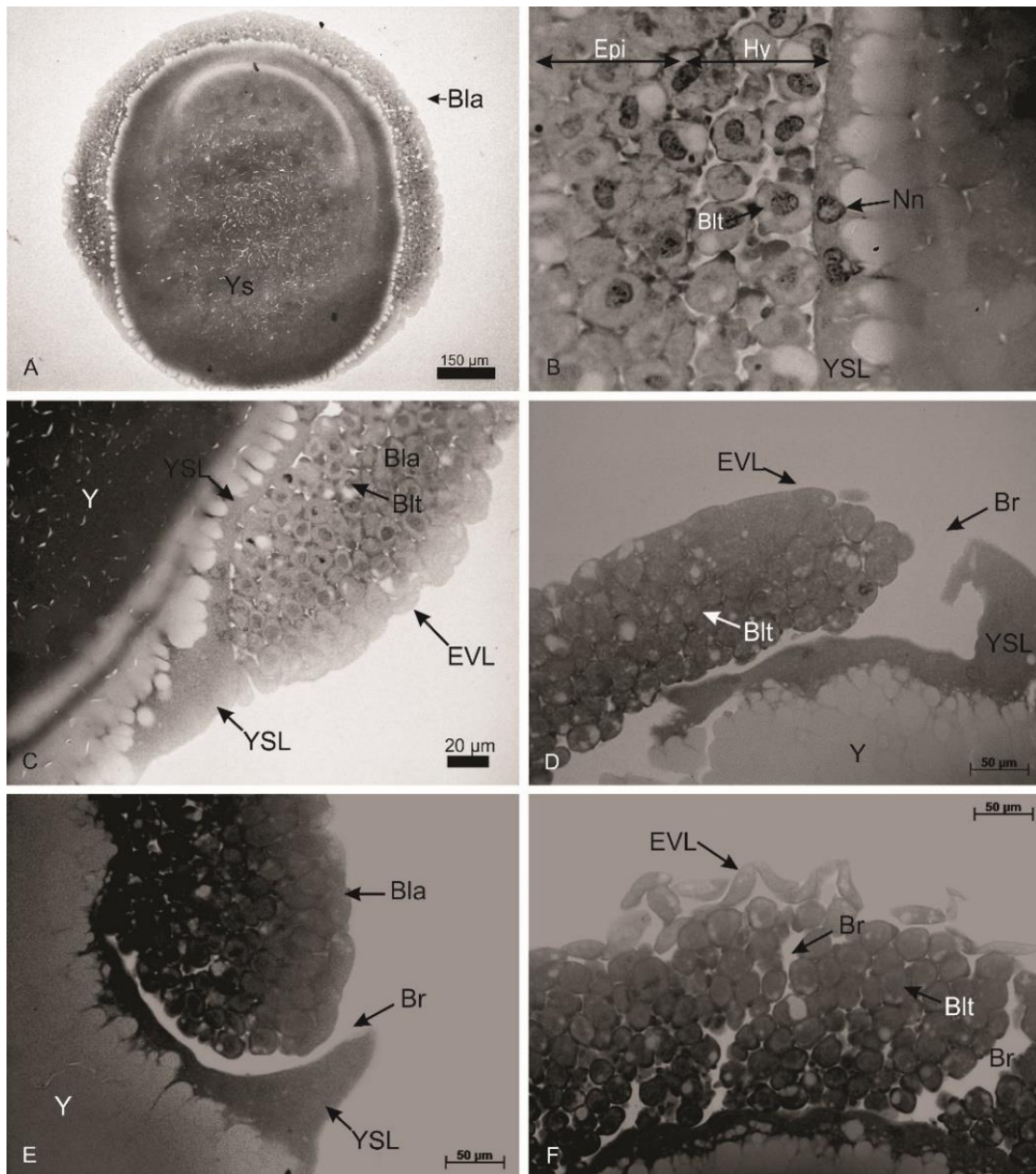
deste nível a quantidade de embriões com alteração no tamanho corpóreo (Figuras 4.5 B-D).

Os tratamentos com frequência de 48Hz além da baixa sobrevivência, também originaram embriões com elevadas taxas de anormalidade, sendo a conformação de massa celular disforme a mais comum (Fig. 4.5 D). Essa anomalia aumenta sua ocorrência até a energia transmitida por pulso atingir $3.9 \cdot 10^{-4} \text{ J/cm}^2$, reduzindo acima destes níveis de energia, tanto a sobrevivência quanto a ocorrência da classe acima citada.

Discussão

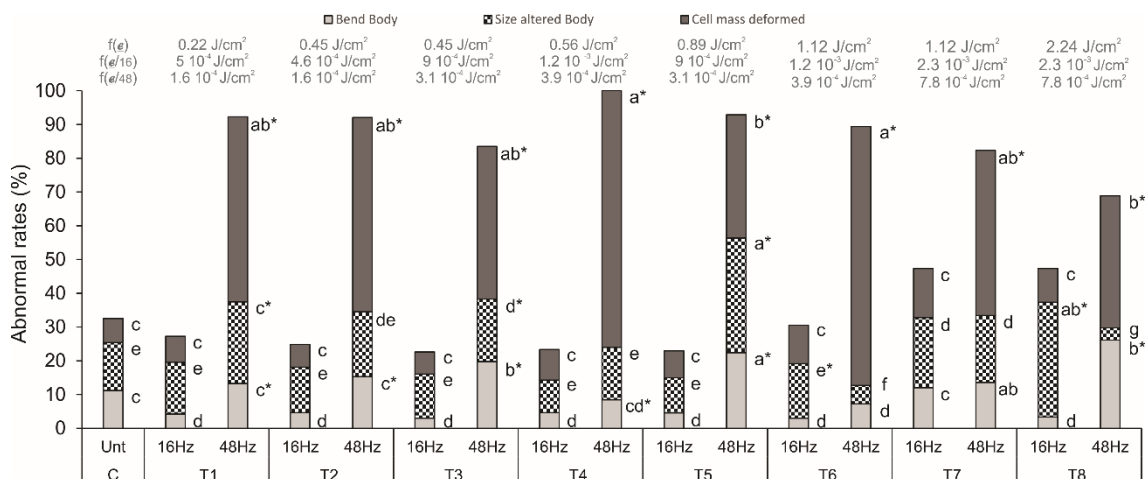
O aparelho de ultrassom Sonopulse II trabalha com frequências de 1 e 3Mhz na formação dos campos acústicos. Contudo, neste trabalho, utilizou-se a frequência de 1MHz permitindo que as ondas atuassem em regiões mais profundas dos tecidos (MOSTAFA et al., 2015; SPEED, 2001; WARD; ROBERTSON, 1996). Associado a isso, o campo mecânico criado pelo ultrassom é formado por duas regiões distintas, sendo a mais distante do transdutor, de formato cônico chamada de “região de Fraunhofer” e a mais próxima, de conformação cilíndrica, denominada de “região de Fresnel”, sendo a mais eficiente para promover os efeitos do ultrassom (MOSTAFA et al., 2015). Considerando essas variáveis, a escolha da distância entre o transdutor e os embriões (4cm), permitiu tanto que o material biológico se localize na região de Fresnel para a frequência de 1Mhz, quanto possibilitou quantificar a densidade energética que chegava aos embriões, considerando a energia que se dissipou no meio (WARD; ROBERTSON, 1996), para entendermos a relação da densidade energética transmitida pelas ondas mecânicas e seus efeitos sobre o desenvolvimento embrionário.

Figura 4.3 - Alterações morfológicas após tratamentos de ultrassom.



Fonte: Elaboração do próprio autor. A, B e C - Controle (estágio de gastrulação); D - Efeito do tratamento com ultrassom (1Mhz) com pulsos de 16Hz; E e F - Efeito do tratamento com ultrassom (1Mhz) com pulsos de 48Hz. Blastoderme - Bla; Saco vitelínico - Ys; Endoderme - En; Blastômeros - Blt; Núcleo normal - Nn; Camada sincicial de vitelo -YSL; Vitelo - Y; Rompimento - Br; Camada envelope - EVL.

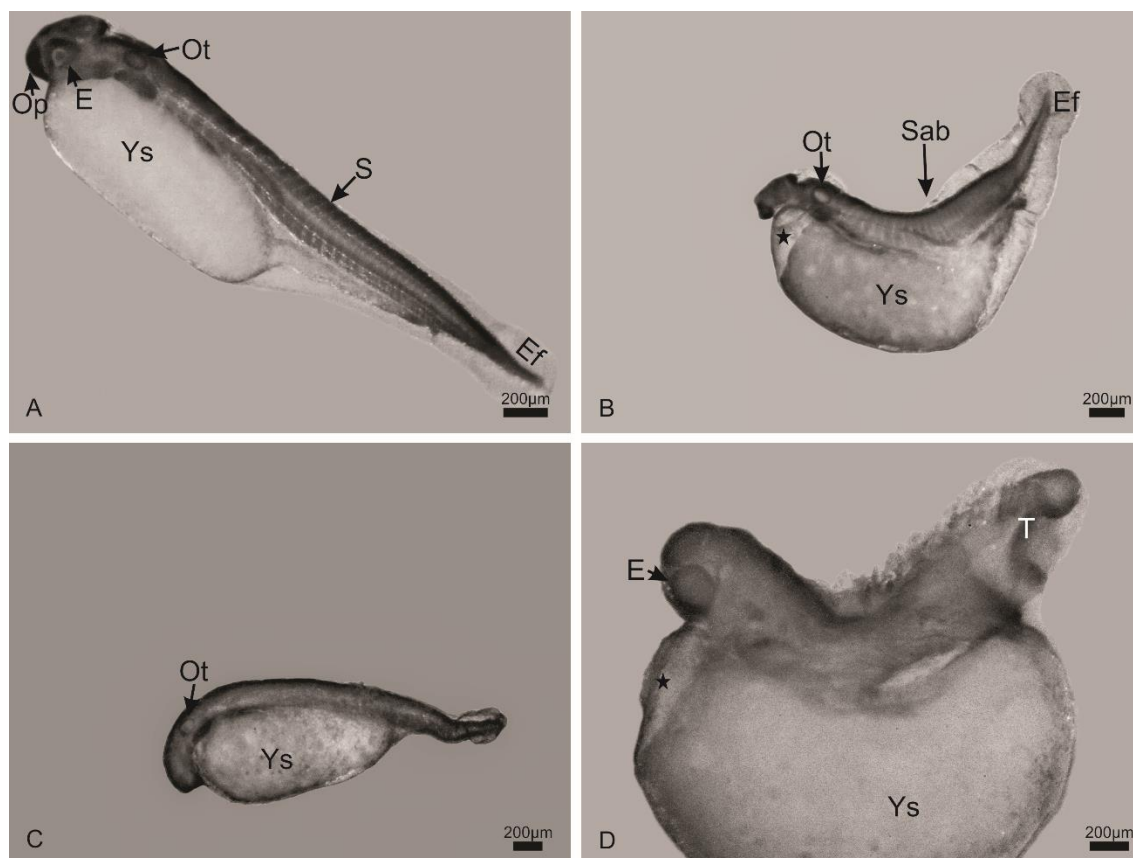
Figura 4.4 - Proporção das categorias de lesões.



Fonte: Elaboração do próprio autor. Coleta 12 horas após a exposição ao campo de ultrassom. T1-T8 - Tratamento de ultrassom; 16 e 48Hz - Frequência de pulso (Hertz). Todas as amostras continham $52 \pm 4,0$ embriões. Letras minúsculas comparam estatisticamente, nos estádios de gastrulação, as categorias de anormalidades nos 16 ou 48Hz através de tratamentos de ultrassom. Asterisco mostra a diferença estatística entre as duas frequências, no mesmo tratamento e na mesma classe de lesão. Densidade de energia-f (ϵ) (W / cm^2); Densidade de energia cada pulso de 16hz- f ($\epsilon / 16$); Densidade de energia cada pulso de 48hz- f ($\epsilon / 48$); Controle - C; Não tratado - U.

Dois são os efeitos biológicos promovidos pelo ultrassom, o térmico e a não térmico (BAKER; ROBERTSON; DUCK, 2001). O térmico é promovido pela utilização de campos contínuos, que devido à grande elevação das vibrações moleculares, promovem aquecimento dos tecidos biológicos, podendo variar de acordo com a densidade do tecido, ou pela sobreposição de ondas refletidas pela parede do sistema (BARNETT et al., 1997; DRAPER; CASTEL; CASTEL, 1995), demonstrando a necessidade da constante movimentação do transdutor sobre a área tratada. Os efeitos não-térmicos, ocorrem devido a formação de um fenômeno conhecido como cavitação, que sem elevar da temperatura devido a utilização de ondas pulsadas, promove um aumento da permeabilidade dos tecidos a medicamentos, proteínas e crioprotetores (BAKER; ROBERTSON; DUCK, 2001; BOUCAUD et al., 2002; DYSON, 1982; JOHNS, 2002; MITRAGOTRI; BLANKSCHTEIN; LANGER, 1995; WANG et al., 2008; WOOD; SEHGAL, 2016). A escolha dos efeitos não térmicos para utilização neste trabalho buscou evitar danos resultados do aquecimento como desnaturação proteica e alterações morfofisiológicas (ANGLES et al., 1991), variáveis que dificultariam ainda mais o processo.

Figura 4.5 - Injúrias 12 horas após os tratamentos de ultrassom.



Fonte: Elaboração do próprio autor. A - Controle (fase de eclosão); B – Corpo curvado; C – Corpo com tamanho alterado; D - Massa celular deformada. Vesícula ótica - Ot; Placode olfativo - Op; Olho - E; Saco vitelino - Ys; Somito - S; Nadadeira embrionária - Ef; Ângulo lateral do corpo -Sab; Aumento da cavidade pericárdica - estrela; Cauda - T.

A cavitação é definida como a formação, crescimento e atividade de cavidades cheias de gás (TER HAAR et al., 1982). Devido ao processo de formação das ondas ultrassônicas ocorrerem por compressão e rarefação das moléculas de um meio elástico, essa variação de pressão faz com que as bolhas de ar, no momento de rarefação aumentem suas dimensões, e dependendo da frequência dos pulsos ultrassônicos se mantenham de forma estável ou instável. Quando instáveis, essas microbolhas implodem promovendo grandes danos mecânicos aos corpos sólidos, tanto pelo choque de pressão e pelo aumento na temperatura que ocorrem no momento da implosão, quanto pelas bolhas criarem uma região interna de baixa pressão ao implodirem recrutando assim o fluido no seu entorno formando e propulsionando jactos fluídicos contra os tecidos biológicos (BARNETT et al., 1997; BRUJAN et al., 2001; FRENKEL; KIMMEL; IGER, 1999). Assim, o controle do fenômeno de cavitação foi de extrema importância pois a bolha também tem uma

função de amplificação das ondas ultrassônicas (KRASOVITSKI et al., 2011), podendo descontrolar os efeitos desejados.

Um dos fatores que promovem o aumento das microbolhas instáveis são ondas produzidas por frequências curtas (APFEL; HOLLAND, 1991). Desta forma, comprova-se neste trabalho que a utilização de frequência de 48z estimulou mais o fenômeno da cavitação do que em 16Hz, sendo um grande indicio para justificar a grande diferença nas taxas de sobrevivência. Outro ponto verificado, é que com o aumento da frequência de pulso, a movimentação dos embriões no fluido era maior, semelhante a pequenos e rápidos “choques mecânicos” que não permitiam a estabilização dos embriões na coluna da solução, promovendo assim sua constante movimentação. Tornou-se claro que, associado a isso, a intensidade de energia transmitida por cada pulso interferiu nos efeitos do campo, uma vez que esses “choques” aumentaram sua intensidade a um nível insustentável, resultando em baixa sobrevivência.

Contudo, apesar da cavitação ser considerada um dos maiores causadores dos efeitos não térmicos, existem relatos de efeitos não térmicos sem a presença de microbolhas. Essa teoria descreve alterações na conformação das bicamadas lipídicas, promovidas pelas ondas de compressão e rarefação que alteram o distanciamento dos folhetos lipídicos constituintes das membranas. Quando a força de rarefação das moléculas do meio é superior a energia que une as bicamadas lipídicas, essa membrana sofre o afastamento das bicamadas, aumentando assim seu raio. Contudo quando o meio sofre o fenômeno de compressão a distância retorna ao seu tamanho original (KRASOVITSKI et al., 2011; WOOD; SEHGAL, 2016).

Os movimentos das bicamadas lipídicas dependem da intensidade do campo ultrassônico. Assim, ao elevar a intensidade do campo, esses afastamentos podem alcançar níveis que permitam tanto um rompimento reversível das membranas biológicas, permitindo a difusão de substâncias de maior peso molecular, ou causar o rompimento e inviabilização desta membrana em níveis elevados de energia (FRENKEL; KIMMEL; IGER, 1999, 2000; KRASOVITSKI et al., 2011). Sendo um dos pontos importantes para sua resistência a abertura dos poros a quantidade de lipídeos poliinsaturados que compõem essa membrana (LEONTIADOU; MARK; MARRINK, 2004).

Outro ponto importante a se entender, é que no caso de tecidos, ou neste trabalho nos embriões, a movimentação das membranas celular não ocorre de forma isolada, pois

essas membranas estão ligadas a um sistema que as coloca adjacentes a outras membranas, fluidos ou interstícios, promovendo então a movimentação de um conjunto de estruturas, o que necessitando de uma maleabilidade mais complexa e uma a energia máxima, que agora deve ser suportada tanto complexo membrana-interstício (KRASOVITSKI et al., 2011).

Desta forma com tudo relatado até aqui, verifica-se neste trabalho que os danos morfológicos promovidos pelos campos de ultrassom podem ser promovidos por uma união de fatores. Um exemplo, é o fenômeno de cavitação que ao acontecer no espaço interblastômeros, existente no estágio de gastrulação, pode aumentar suas extensões rompendo a interação entre as células. Esse fato ainda pode ser agravado pela vibração da bicamada lipídica celular, que ao entrar em ressonância com o campo mecânico, vibram os folhetos lipídicos podendo aumentar os espaços formados, ou ainda, quando ocorre em maiores extensões como a YSL rompe sua coesão com a blastoderme e/ou vitelo.

Dentre as anomalias observadas, a conformação de uma massa disforme é em nosso entender o mais preocupante deles. Essa anomalia origina uma massa celular sem nenhuma forma definida apoiada e nutrida por uma região vitelina, que permite sua manutenção por um período de 12 hours. Essa classe de lesão aparece muito pronunciada nos embriões que sobreviveram ao tratamento sob campo de 48Hz, sendo maior suas proporções nos tratamentos T4 e T6, que possuem, para essa faixa de frequência, taxas de sobrevivência mais elevada e apresentam maior densidade energética por pulso. Após essa quantidade de energia, a sobrevivência cai drasticamente reduzindo suas concentrações. Em 16Hz não existe diferença estatística em T4 e T6, contudo observa-se um ligeiro aumento dessa classe de anormalidade, podendo ser um indicativo de maior dano promovido pelos tratamentos.

Assim, conclui-se que a utilização do campo ultrassônico pulsado de 1Mhz para embriões de *Prochilodus lineatus*, torna-se viável quando utilizamos pulsos de 16Hz com uma densidade energética total não maior do que $1.12\text{W}/\text{cm}^2$, mantendo a energia transmitida por pulso inferior a $3.9 \cdot 10^{-4} \text{W}/\text{cm}^2$, evitando rompimento tecidual a curto prazo e alterações morfofisiológicas no desenvolvimento embrionário, tornando-se útil e/ou auxiliar no processo de criopreservação.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais - CEPTA / ICMBIO, que forneceu os peixes e as instalações utilizadas neste

estudo e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, com o apoio financeiro (Processo 2013/02588-5).

Bibliografia

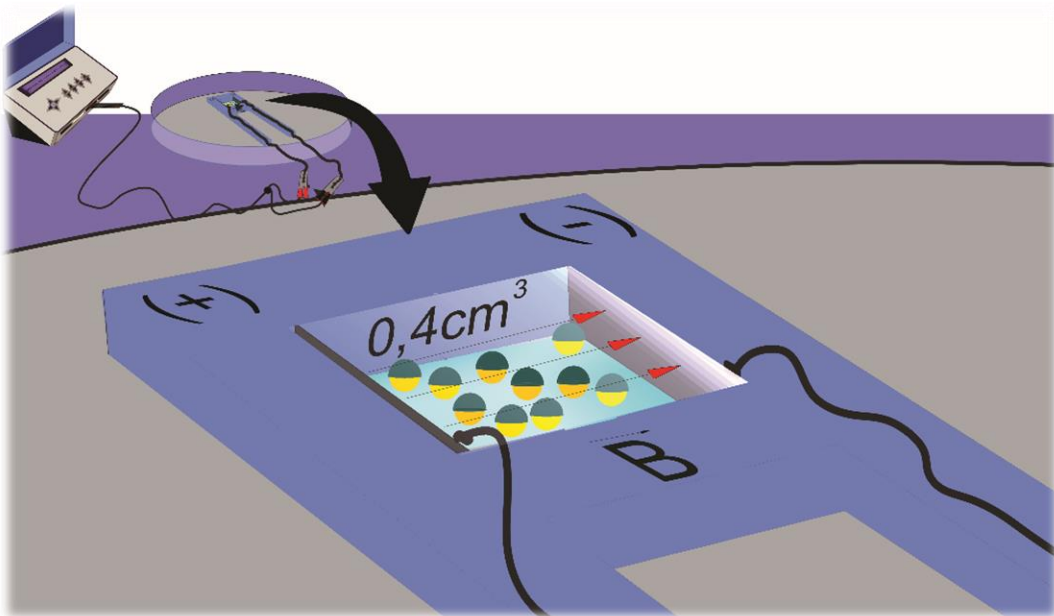
- ANGLES, J. M. et al. Effects of pulsed ultrasound and temperature on the development of rat embryos in culture". **Teratology**, v. 43, n. 6, p. 551, 553–4, 1991.
- APFEL, R. E.; HOLLAND, C. K. Gauging the likelihood of cavitation from short-pulse, low-duty cycle diagnostic ultrasound. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 17, n. 2, p. 179–185, 1991.
- BAKER, K. G.; ROBERTSON, V. J.; DUCK, F. A. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. **Physical therapy**, v. 81, n. 7, p. 1351–8, jul. 2001.
- BARNETT, S. B. et al. Review The sensitivity of biological tissue to ultrasound. **Ultrasound in Med. & Biolin Med. & Biol.**, v. 23, n. 6, p. 805–812, 1997.
- BOUCAUD, A. et al. Effect of sonication parameters on transdermal delivery of insulin to hairless rats. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, v. 81, n. 1-2, p. 113–9, 17 maio 2002.
- BRUJAN, E. A. et al. The final stage of the collapse of a cavitation bubble close to a rigid boundary. **PHYSICS OF FLUIDS**, v. 14, p. 85–92, 2001.
- DRAPER, D. O.; CASTEL, J. C.; CASTEL, D. Rate of temperature increase in human muscle during 1 MHz and 3 MHz continuous ultrasound. **The Journal of orthopaedic and sports physical therapy**, v. 22, n. 4, p. 142–50, 1995.
- DYSON, M. Non-thermal cellular effects of ultrasound. **Br. Journal Cancer(1982)**, v. 165, p. 165–171, 1982.
- FRENKEL, V.; KIMMEL, E.; IGER, Y. Ultrasound-induced cavitation damage to external epithelia of fish skin. **Ultrasound in Med. & Biol.**, v. 25, n. 8, p. 1295–1303, 1999.
- FRENKEL, V.; KIMMEL, E.; IGER, Y. ULTRASOUND-INDUCED INTERCELLULAR SPACE WIDENING IN FISH EPIDERMIS. **Ultrasound in Med. & Biol.**, v. 26, n. 3, p. 473–480, 2000.
- HAGEDORN, M. et al. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option. **Cryobiology**, v. 49, n. 2, p. 181–9, out. 2004.
- HARVEY, B.; KELLEY, R. N.; ASHWOOD-SMITH, M. J. Permeability of intact and dechorionated zebra fish embryos to glycerol and dimethyl sulfoxide. **Cryobiology**, v. 20, n. 4, p. 432–9, ago. 1983.
- JARAMILLO, R. et al. Caracterización electroforética de las proteínas del corion normal Electrophoretic characterization for both normal and hard chorion proteins of *Salmo salar*. **medicina veterinaria**, v. 65, p. 59–65, 2012.
- JOHNS, L. D. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: The frequency resonance hypothesis. **Journal of Athletic Training**, v. 37, n. 3, p. 293–299, 2002.
- KRASOVITSKI, B. et al. Intramembrane cavitation as a unifying mechanism for ultrasound-induced bioeffects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 8, p. 3258–3263, 2011.

- KUMARESAN, A et al. Cryopreservation-induced alterations in protein tyrosine phosphorylation of spermatozoa from different portions of the boar ejaculate. **Cryobiology**, v. 63, n. 3, p. 137–44, dez. 2011.
- LEONTIADOU, H.; MARK, A. E.; MARRINK, S. J. Molecular dynamics simulations of hydrophilic pores in lipid bilayers. **Biophysical journal**, v. 86, n. 4, p. 2156–2164, 2004.
- MARTINEZ DE ALBORNOZ, P. et al. The evidence of low-intensity pulsed ultrasound for in vitro, animal and human fracture healing. **British medical bulletin**, v. 100, p. 39–57, jan. 2011.
- MASSIP, A. Review Cryopreservation of Embryos of Farm Animals. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, p. 49–55, 2001.
- MITRAGOTRI, S.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. Ultrasound-Mediated Transdermal Protein. **Science**, v. 269, n. August, p. 11–14, 1995.
- MITRAGOTRI, S.; KOST, J. Low-frequency sonophoresis: a review. **Advanced drug delivery reviews**, v. 56, n. 5, p. 589–601, 27 mar. 2004.
- MOSTAFA, J. et al. Electromagnetic fields and ultrasound waves in wound treatment: A comparative review of therapeutic outcomes. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 12, n. March, p. 185–195, 2015.
- MULDREW, K.; MCGANN, L. E. **Mechanisms of intracellular ice formation.** **Biophysical journal**, mar. 1990. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3360586&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>
- NINHAUS-SILVEIRA, A. et al. Cryopreservation of Semen From Functional Sex-Reversed Genotypic Females of the Rainbow Trout , *Oncorhynchus mykiss*. v. 49, n. January, p. 73–77, 2006.
- NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote (Cambridge, England)**, v. 14, n. 3, p. 217–29, ago. 2006.
- POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, p. 666, 1949.
- RAWSON, D. M. et al. Field emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy studies of the chorion , plasma membrane and syncytial layers of the gastrula-stage embryo of the zebrafish *Brachydanio rerio*: a consideration of the structural and function. **Aquaculture Research**, p. 325–336, 2000.
- ROBLES, V. et al. Vitrification of turbot embryos: preliminary assays. **Cryobiology**, v. 47, n. 1, p. 30–39, ago. 2003.
- ROBLES, V. et al. Embryo cryopreservation: What we know until now. In: ELSA CABRITA, VANESA ROBLES, P. H. (Ed.). **Methods in reproductive aquaculture: Marine and Freshwater Species**. New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2009. p. 265–294.
- SANCHES, E. A. et al. Storage of Steindachneridion parahybae oocytes at different temperatures. **Animal Reproduction Science**, v. 151, n. 3-4, p. 262–268, 2014.
- SPEED, C. A. Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 40, n. 12, p. 1331–6, dez. 2001.
- STREIT-JR, D. P. et al. Cryopreservation of Embryos and Oocytes of South American Fish Species. In: YAMASHIRO, H. (Ed.). **Recent Advances in Cryopreservation**. [s.l.] InTech, 2014. p. 130.

- TER HAAR, G. et al. Ultrasonically induced cavitation in vivo. **The British journal of cancer. Supplement**, v. 5, p. 151–5, 1982.
- UTESHEV, V. K. et al. The Survival of Amphibian Embryos after Continuous Ultrasonic Treatment. **BIOPHYSICS**, v. 51, n. 3, p. 484–488, 2006.
- WANG, R. Y. et al. Ultrasound enhanced methanol penetration of zebrafish (*Danio rerio*) embryos measured by permittivity changes using impedance spectroscopy. **European Biophysics Journal**, v. 37, n. 6, p. 1039–1044, 2008.
- WARD, A. R.; ROBERTSON, V. J. Dosage factors for the subaqueous application of 1MHz ultrasound. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 77, n. 11, p. 1167–1172, 1996.
- WOOD, A. K. W.; SEHGAL, C. M. A review of low-intensity ultrasound for cancer therapy. **Ultrasound Med Biol**, v. 8, n. 5, p. 583–592, 2016.
- YANG, K. H. et al. Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 14, n. 5, p. 802–809, 1996.
- YASUI, G. S. et al. A sperm cryopreservation protocol for the loach *Misgurnus anguillicaudatus* and its applicability for other related species. **Animal reproduction science**, v. 116, p. 335–345, 2009.
- ZHANG, S.; DUNCAN, J. H.; CHAHINE, G. L. The behavior of a cavitation bubble near a rigid wall. **Kluwer academic Publishers**, p. 429–436, 1994.
- ZHANG, T. et al. Studies on membrane permeability of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes in the presence of different cryoprotectants. **Cryobiology**, v. 50, n. 3, p. 285–93, jun. 2005.

CAPÍTULO 5

Efeitos do campo elétrico polarizado sobre o desenvolvimento embrionário de *Prochilodus lineatus*.



Raphael da Silva Costa

**Efeitos do campo elétrico polarizado sobre o desenvolvimento embrionário de
Prochilodus lineatus.**

Raphael da Silva Costa ^{a,c}, Fabrício Marçal Silva de Souza ^a, José Augusto Senhorini ^b, Cristiane Bashiyo-Silva^a, Geovanna Carla Zacheo Coelho^a, Rosicleire Verissimo Silveira ^a, Alexandre Ninhaus-Silveira ^{a*}.

^a Laboratório de Ictiologia Neotropical – LINEO, Depto de Biologia e Zootecnia, FEIS/UNESP – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Avenue Brasil, 56, 15085-000, Ilha Solteira, São Paulo, Brazil. Phone: +55 018 37431285, Fax: +55 018 37422140

^b Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais at Instituto Chico Mendes da Conservação de Biodiversidade – CEPTA/ICMBio, Pirassununga, São Paulo, Brazil

^c Pós-Graduação em Biologia Animal, IBILCE/UNESP/Campus de São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

* Corresponding author. Tel: +551837431285; Fax: +551837422140

E-mail address: ninhaus@bio.feis.unesp.br

Resumo

Com vistas a contribuir para o desenvolvimento de uma metodologia de criopreservação de embriões de peixes, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de um campo elétrico polarizado (Pef) sobre embriões de *Prochilodus lineatus*, visando a possibilidade do aumento da permeabilidade celular e tecidual destes. Embriões no estágio de gástrula foram submetidos aos campos elétricos polarizado, gerados pelo Sonopulse II da Ibramed. 10 embriões foram acondicionados em um “electric field chamber”, sendo expostos a campos de 0.42 a 8.5 joules (J). Ao entrarem em contato com o Pef, os embriões alteraram suas morfologias, tornando-se primeiramente elípticos, posteriormente curvados e podendo terminar com o rompimento tecidual na região do saco vitelino ou retornar a sua morfologia inicial. Doze horas após os tratamentos, os embriões foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2%, sendo analisados sob estereomicroscopia - Leica M212; Microscopia óptica - Zeiss Axio Scope A1 e elétron-micrografado em Microscópio Eletrônico de Varredura Leica EVO L515. Os dados foram avaliados utilizando o software “R Development Core Team”, aplicando os testes Wilcoxon-Mann-Whitney e Kruskal Wallis. Apesar quantificar-se taxas de sobrevivência igual a 71% em 0.42J, sua normalidade foi baixa $18.2 \pm 5.7\%$ (anormal: 0.42J $53 \pm 3\%$). Dentre as anomalias observadas, destaca-se indivíduos com a seu blastoderme transformado em uma massa celular sem forma ou dividida, má formação do tubo neural, e acefalia. Duas anomalias exclusivas foram verificadas, sendo a primeira resultante do campo pulsado, que promoveu o rompimento da vesícula vitelina e a segunda pelo uso do próprio campo elétrico, que em alguns embriões promoveu a fusão da membrana coriônica à epiderme embrionária. Desta forma, conclui-se que os embriões de *Prochilodus lineatus* resistem aos tratamentos com campo elétrico polarizado, apesar de estimularem o aumento das taxas de anormalidade ao longo do desenvolvimento. Estes resultados podem auxiliar o desenvolvimento de tecnologias para incorporação de substâncias em tecidos ou células.

Palavras-chave: Campo elétrico, eletroporação, embriologia, gástrula, biotecnologia.

Introdução

A partir do primeiro protocolo de criopreservação, que criopreservou espermatozoides de em solução de glicerol (POLGE; SMITH; PARKES, 1949), inúmeras tentativas vêm buscando a preservação do material genético materno (oócitos ou embriões), enfrentando infindáveis barreiras e resultados negativos (MASSIP, 2001; ROBLES et al., 2003; SANCHES et al., 2014; STREIT-JR et al., 2014). Cada vez mais, comprova-se que a inviabilidade da técnica para embriões, se deve a constituição embrionária, que possui complexos sistemas biológicos associados a morfologia que juntos formam grandes barreiras aos processos de crioconservação (HAGEDORN et al., 2004; HARVEY; KELLEY; ASHWOOD-SMITH, 1983; MULDREW; MCGANN, 1990; RAWSON et al., 2000; ROBLES et al., 2009)

Há décadas as áreas medicas e fisioterapicas e da biotecnologia de transgênicos utilizam metodologias que permitem aumentar a permeabilidade de tecidos, promovendo maior difusão de medicamentos e até mesmo a transferência de compostos de maior peso molecular, como fragmentos de DNA (MIR; ORLOWSKI, 1999; WEAVER; CHIZMADZHEV, 1996). Contudo, essa realidade só se tornou possível junto a utilização de tecnologias como forças acústicas (BARNETT et al., 1997; TER HAAR et al., 1982), modificações de superfície (JUNG et al., 2001) e forças elétricas (COSTER, 1965), que alteram momentaneamente a semipermeabilidade das membranas celulares e dos tecidos.

A eletroporação, que será abordada neste trabalho, é uma das metodologias que permite aumentar a permeabilidade das células e tecidos. Essa técnica também conhecida como electroporabilização, promove uma perturbação estrutural transitória dos folhetos lipídicos das membranas celulares, como consequência da aplicação de pulsos elétricos, em distintos tipos de membranas (EISMANN; ALENCASTRO, 2011), desde artificial como lipossomas (NEUMANN; KAKORIN, 1996) até mesmo em estruturas mais complexas como stratum corneum (WEAVER; CHIZMADZHEV, 1996).

O aumento da permeabilidade desta técnica, resulta da interação entre o dipolo de uma partícula e o gradiente espacial do campo elétrico (PETHIG, 1996). Assim, quando uma célula ou outra partícula polarizada, são colocadas em um campo elétrico, suas cargas livres são induzidas a se separarem, formando dois polos (dipolo elétrico) de forças opostas e com intensidades iguais (VOLDMAN, 2006). Essa mudança, faz com que os polos gerem

forças opostas de tensão promovendo uma alteração morfológica transitória (BENZ; BECKERS; ZIMMERMANN, 1979; SUKHORUKOV; MUSSAUER; ZIMMERMANN, 1998; ZIMMERMANN et al., 1976).

Contudo, quando a força do campo elétrico atinge níveis adequados, as membranas podem sofrer a formação de poros ou até mesmo a fusão com as membranas adjacentes (ZIMMERMANN et al., 2000). Junto a formação do dipolo, as cargas livres associadas a semipermeabilidade das membranas, promovem o acúmulo de cargas opostas entre o meio intra e extracelular, resultando no aumento da diferença de potencial ali existente (d.d.p.). Essa d.d.p. tende a aumentar até atingir o limite da rigidez dielétrica das membranas, no entorno de 1V (NEUMANN et al., 1982; SALE; HAMILTON, 1967), formando após isso, poros transitórios que tanto reduzem essa ddp ao permitem o fluxo de íons, quanto possibilitam o escape de metabólitos, o aumento da captação de drogas, sondas moleculares e DNA pelas células (VOLDMAN, 2006), sendo os efeitos dos campo elétrico diretamente influenciado pela constituição lipídica das membranas (HUANG; WHEELDON; THOMPSON, 1964).

Desta forma, objetiva-se avaliar os efeitos do campo elétrico polarizado, sobre desenvolvimento de embriões de *Prochilodus lineatus*, buscando assim identificar uma densidade energética máxima suportada pela espécie, visando futuros tratamentos para o aumento da permeabilidade embrionária.

Material e métodos

Embriões

O manejo dos reprodutores e a obtenção dos embriões ocorreram conforme a descrição do capítulo 1.

Campo elétrico

Para formação dos seis campo elétrico polarizado (Tabela 5.1) utilizou-se o aparelho Sonopulse II da Ibramed (ANVISA Nº: 10360310025), sendo os parâmetros corrente elétrica (mA), diferença de potencial - d.d.p (Volts) e potência (Watts) mensurados

por meio de um multímetro Minipa (ET2042D) (Figura 5.2), calculando-se também a energia fornecida [f(ε)] através da equação 1.

Amostragens de 10 embriões foram separados e acondicionados em uma câmara de campo elétrico (Figura 5.1), permitindo gerar um campo elétrico polarizado (+) entre dois eletrodos de alumínio adaptados a uma câmara com volume de 0,4cm³, preenchido com solução embrionária (12mM Nacl + 1mM KCL + 1,5 CaCl₂ + 1,5mM MgCl₂).

Tabela 5.1 - Parâmetros do campo elétrico polarizado. D – Duty factor (campo contínuo = 1; campo pulsado = 0.5), d.d.p. – Diferença de potencial (V), I – corrente elétrica (mA) e T – tempo (segundos).

Tratamentos	Tempo (s)	d.d.p. (V)	I (mA)	D
T1	15	19	3,1	0,5
T2	30	19	3,1	0,5
T3	15	39,2	5,9	0,5
T4	30	39,2	5,9	0,5
T5	15	39,2	5,9	1
T6	30	39,2	5,9	1
T7	15	62	18,3	0,5

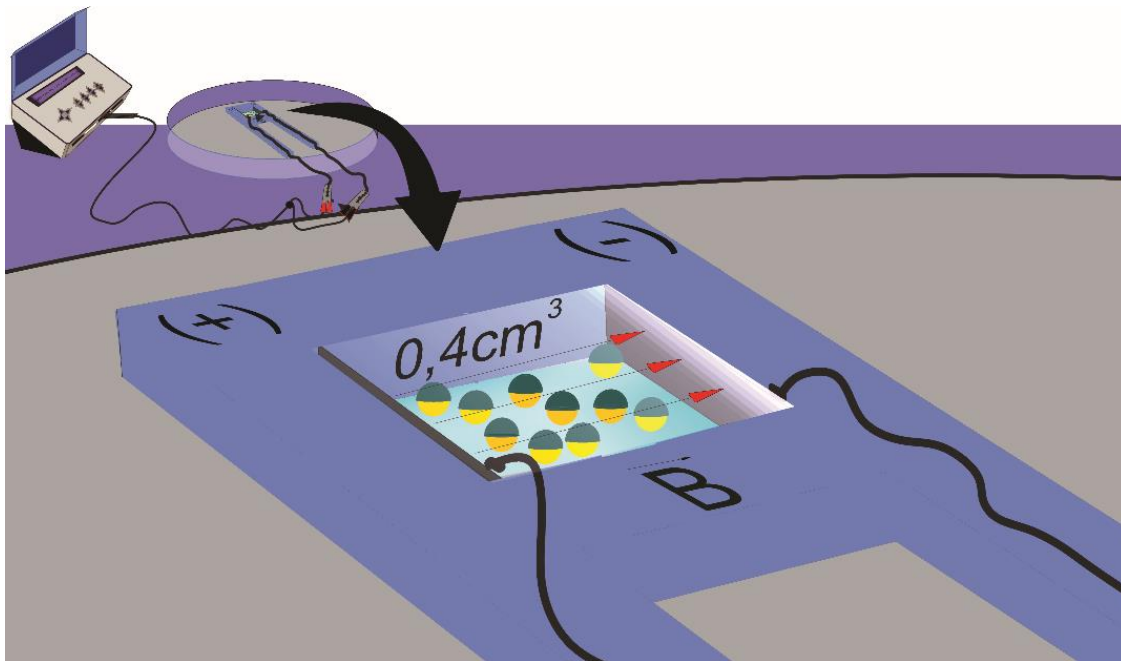
Fonte: Elaboração do próprio autor.

Os grupos amostrais foram expostos a campos de 0,4, 0,9, 1,7, 3,5, 6,9, e 8,5 joules, sendo o controle experimental realizado submetendo os embriões as mesmas condições metodológicas, sem o fornecimento energético (0 Joule). Após os tratamentos, os embriões foram mantidos em incubadoras por doze horas. Sendo posteriormente fixados em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2% pH 7,2 para futuras análises.

Equação 1 - (Energia temporal) $f(\epsilon)$ -Energia temporal acumulada (Joule), U – Diferença de potencial (V), i – corrente (mA), T – tempo (segundos) e D – duty (1 = campo elétrico contínuo).

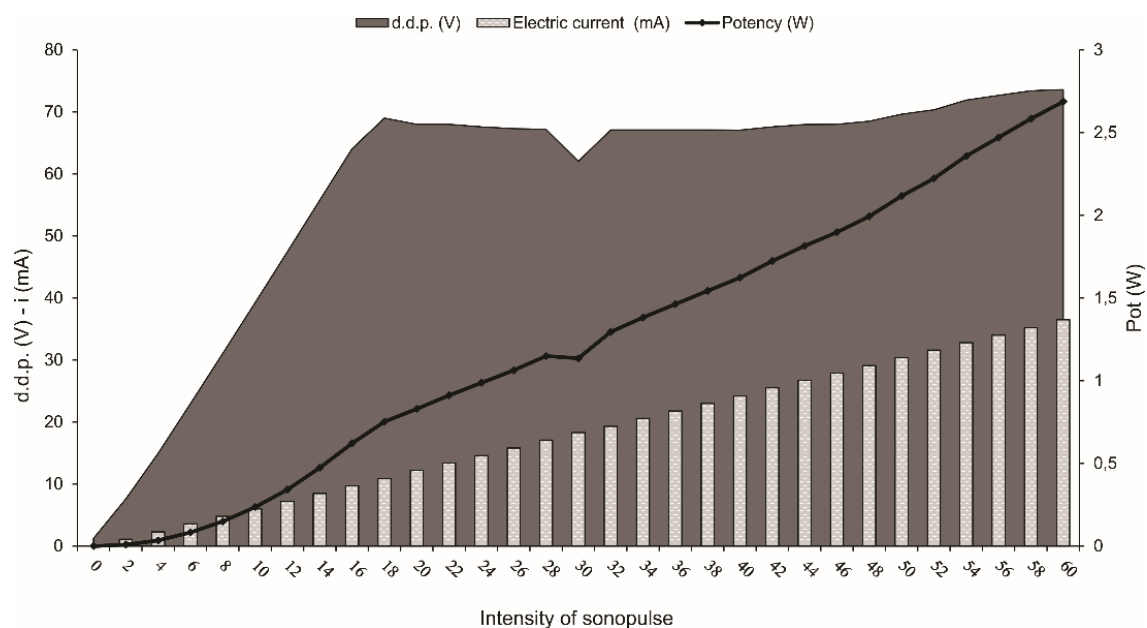
$$f(\epsilon) = \frac{U \cdot i \cdot T \cdot D}{1000} \text{ (joule)}$$

Figura 5.1 - Câmara elétrica.



Fonte: Elaboração do próprio autor. (+) - Polo positivo; (-) - Polo Negativo, Setas - Direção campo elétrico polarizado.

Figura 5.2 - Parâmetros do campo elétrico.



Fonte: Elaboração do próprio autor. d.d.p. - Diferença de potencial (Voltz); i- Corrente elétrica (mA); Pot – Potência (Watts).

Estereomicroscopia

Os procedimentos para coloração e análises ocorreram conforme a descrição do capítulo 2.

Histologia

Os procedimentos para fixação, microtomia e coloração ocorreram conforme a descrição do capítulo 2.

Microscopia eletrônica de varredura

Os embriões foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2%, desidratados em álcool, secos em um Ponto Crítico Leica EM CPD300 e metalizados em um Metalizador Q150TE da Leica. O material foi examinado e elétron-micrografado em Microscópio Eletrônico de Varredura Leica EVO L515, no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade estadual paulista -UNESP, Campus de Ilha Solteira, departamento de Física e Química.

Análise estatística.

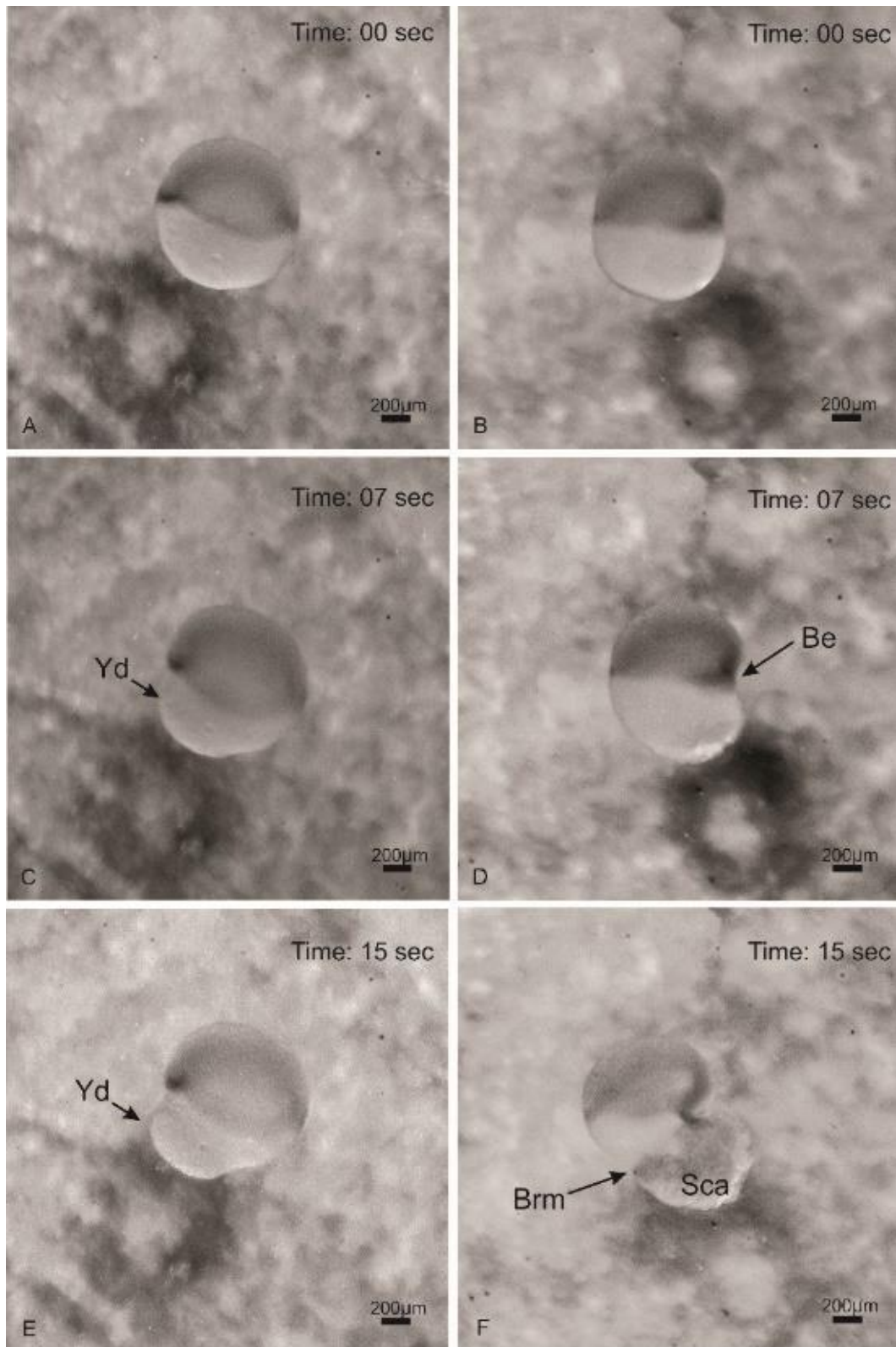
Todos os tratamentos foram realizados inteiramente ao acaso e avaliados utilizando o software “R Development Core Team (2010)”. Os testes contaram com cinco repetições contendo $10 \pm 0,8$ embrião nas avaliações de “Campo elétrico polarizado. Para as comparações, aplicou-se os testes de Bartlett e Shapiro-Wilk seguido pelo teste Wilcoxon-Mann-Whitney e Kruskal Wallis.

Resultados

A influência do campo elétrico sobre os embriões pode ser visualizada, verificando suas alterações morfológicas ao longo do tempo de tratamento (Figura 5.3). Inicialmente, os embriões alteravam sua forma normal (Figuras 5.3 A-B) adotando uma conformação elíptica (Figura 5.3 C) com posterior curvatura (Figuras 5.3 D), podendo terminar com o rompimento tecidual na região do saco vitelino, promovendo o escape de vitelo (Figuras 5.3 F). Contudo, quando a quantidade de energia fornecida se mostrava adequada, as alterações morfológicas externas não promoviam rompimento (Figuras 5.3 E), sendo possível retomar a sua morfologia original.

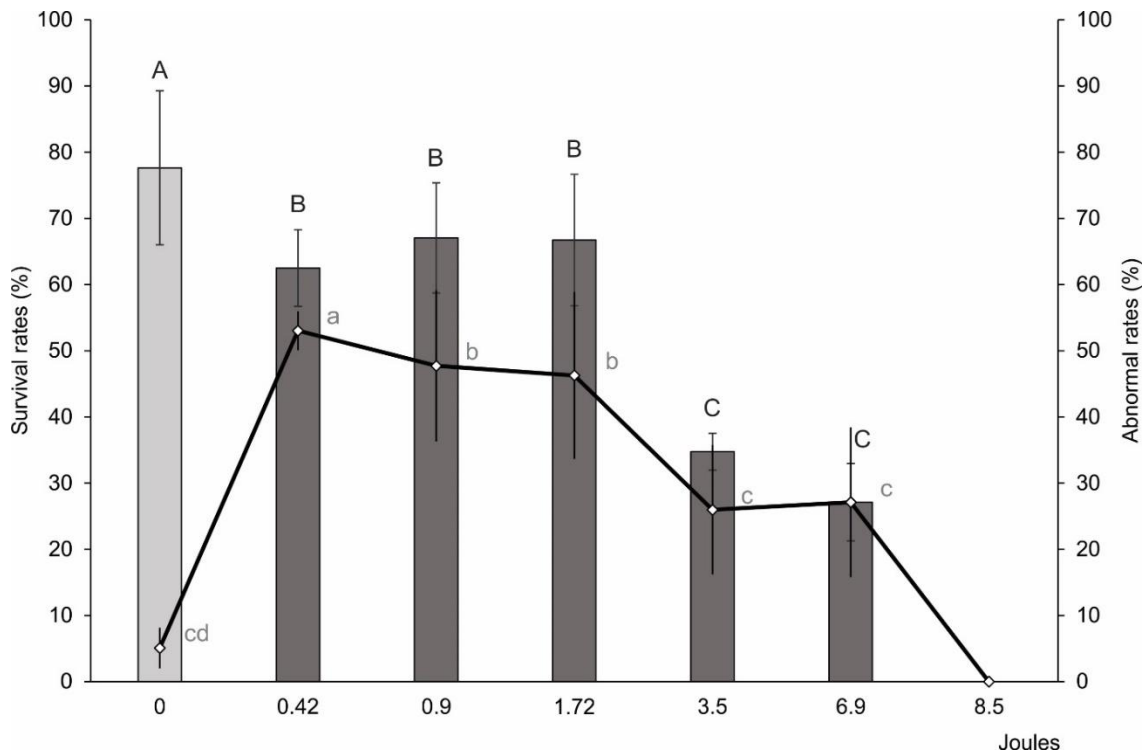
Entretanto, apesar uma parcela considerável dos embriões sobreviverem a aplicação do campo elétrico, chegando a índices superiores a 60%, 12 horas após tratamentos, as taxas de anormalidades foram altas, atingindo nos tratamentos com maior sobrevivência (0,4J – 1,7J) $49 \pm 3,5\%$ (Figura 5.4). Comprovou-se também, que a taxa de sobrevivência embrionária é inversamente proporcional a quantidade de energia fornecida ($\rho = - 0,75$) (Figura 5.5 A), contudo, a taxa de anormalidade não se correlacionou com os níveis energéticos (Figura 5.5 B).

Figura 5.3 - Efeito do campo elétrico sobre a morfologia embrionária.



Fonte: Elaboração do próprio autor. A, C e E – Campo elétrico contínuo (T4); B, D e F – Campo elétrico pulsado (T5), A - F- 3.5 Joules. Dilatação do saco vitelino – Yd; Curvatura – Be; Rompimento da membrana – Brm and escape do vitelo – Sca.

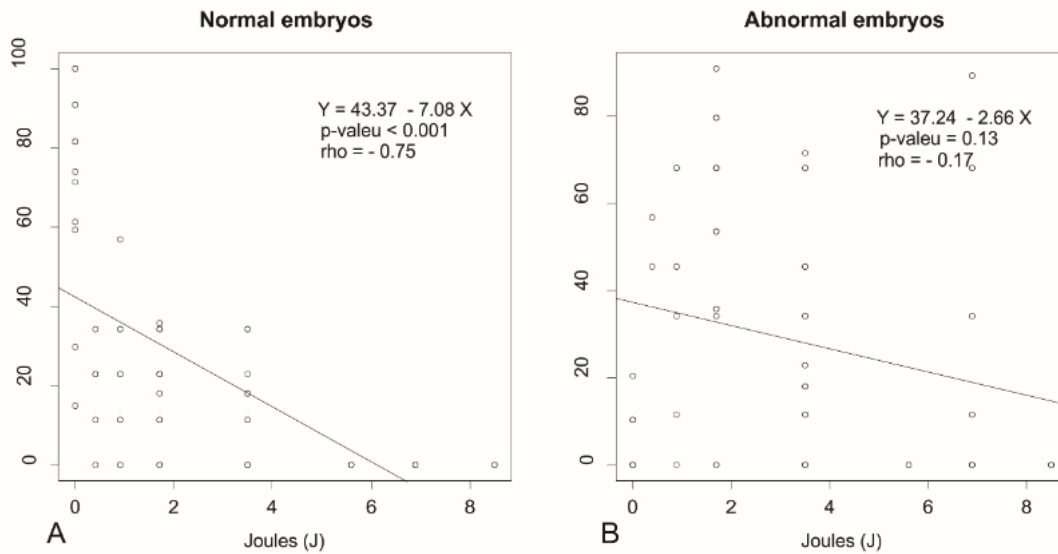
Figura 5.4 - Sobrevivência embrionária de *Prochilodus lineatus* doze horas após a exposição ao campo elétrico.



Fonte: Elaboração do próprio autor. Taxas anormais - Embriões com morfologia alterada após os tratamentos elétricos. Todas as amostras continham $10 \pm 0,8$ embriões. Os dados são apresentados como a percentagem média em relação ao controle \pm desvio padrão. As letras maiúsculas comparam estatisticamente, nos estádios de gastrulação, as taxas de sobrevivência (barra). As letras minúsculas comparam estatisticamente, nos estádios de gastrulação, as taxas de anormalidade (linha).

Morfologicamente, doze horas após os tratamentos, os embriões com características normais de desenvolvimento (Figuras 5.6 A-B) apresentavam suas estruturas externas definidas, sendo facilmente distinguível olhos, que histologicamente apresentavam retina e lente claramente estruturadas (Figura 5.6 C), vesícula ótica, presença de somitos formado pelo alinhamento dos mioblastos e mioseptos (Figura 5.6 D) e uma cauda proporcionalmente longa e reta (Figura 5.6 A). Dorsalmente, é possível observar o fechamento do sulco neural delimitado pelas dobras neurais (Figura 5.6 B). Seu saco vitelino se configura como uma região composta por glóbulos de vitelo revestidos por uma camada sincicial (YSL), que possui um aspecto linear, compacto e denso, e mais externamente, por um epitélio de revestimento (Figura 5.7 A).

Figura 5.5 - Correlação de Spearman entre os níveis de energia e as taxas de normalidade e anormalidade.



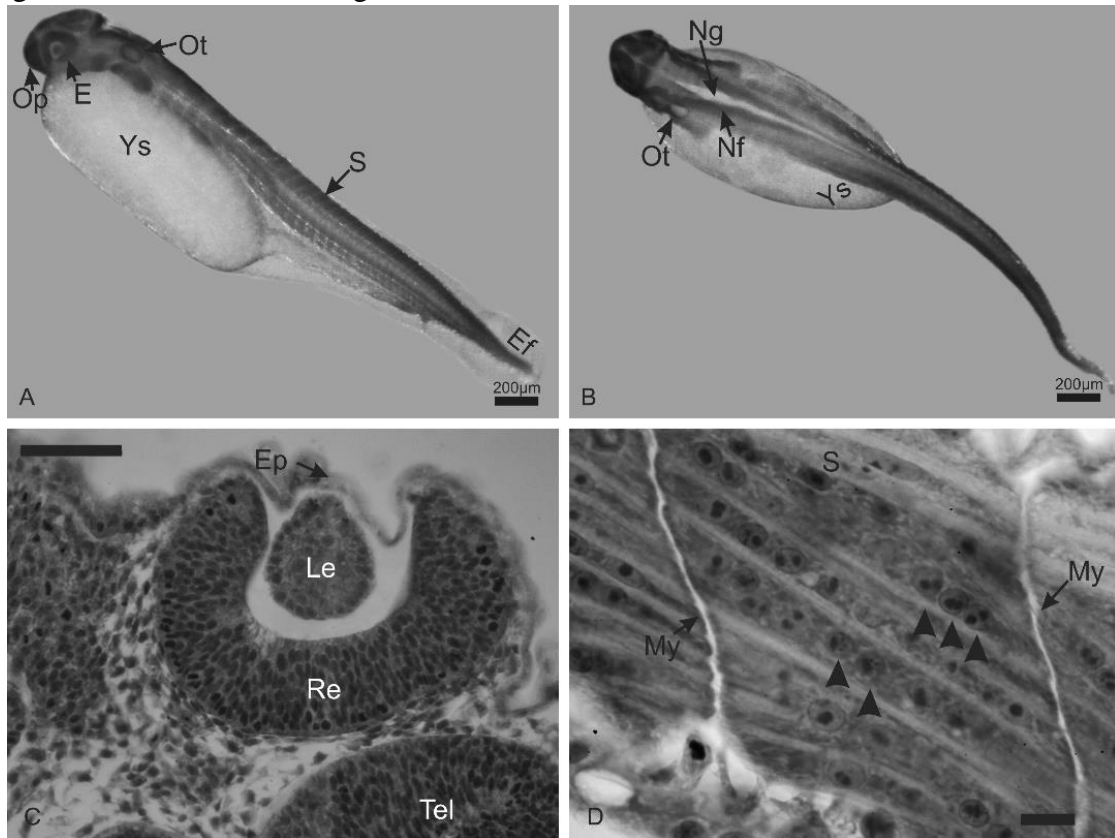
Fonte: Elaboração do próprio autor.

Dentre as deformidades encontradas, destaca-se indivíduos com a sua blastoderme transformado em uma massa celular sem estruturas morfológicas aparentes (Figura 5.7 B); nestes indivíduos, o padrão de alinhamento dos blastômeros não ocorre, formando uma mistura de blastômeros íntegros com grupos de células mortas (Figura 5.7 C), má formação do tubo neural (Figura 5.7 D), divisão do blastoderme (Figura 5.8 A-B) e acefalia (Figura 5.8 B). Alguns indivíduos anômalos apresentavam olhos vestigiais (Figuras 5.7 D - 5.8 A) sem a presença de lente e com uma retina anormal (Figura 5.8 C), não formando uma estrutura funcional. A maioria dessas anomalias observadas não foram específicas a nenhuma das classes de tratamento energético, sendo algumas encontradas até mesmo no controle.

Contudo, duas anomalias importantes e exclusivas foram verificadas. A primeira ocorre apenas no campo pulsado que em alguns casos promoveu o rompimento da vesícula vitelina com extravasamento de vitelo (Figura 5.8 D), mostrando que os níveis energéticos podem promover tanto o rompimento do epitélio (Figura 5.9 A), quanto o rompimento dele junto a YSL (Figura 5.9 B). Contudo, verificou-se que, em alguns casos, apesar de não ter se rompido, a YSL tornou-se uma estrutura com aspecto esponjoso (Figura 5.9 C). A

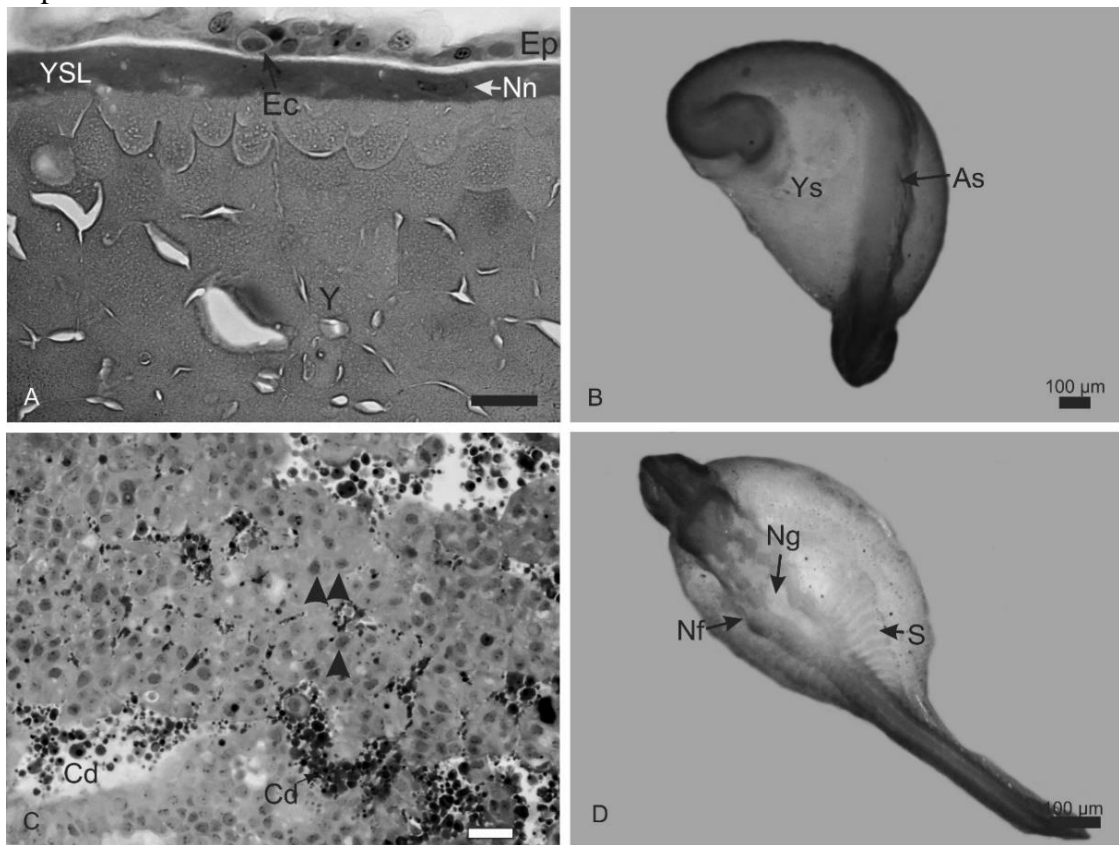
segunda característica a observação de embriões com suas membranas coriônicas fundidas à epiderme embrionária (Figura 5.9 D).

Figura 5.6 - Análise morfológica de *Prochilodus lineatus* controle.



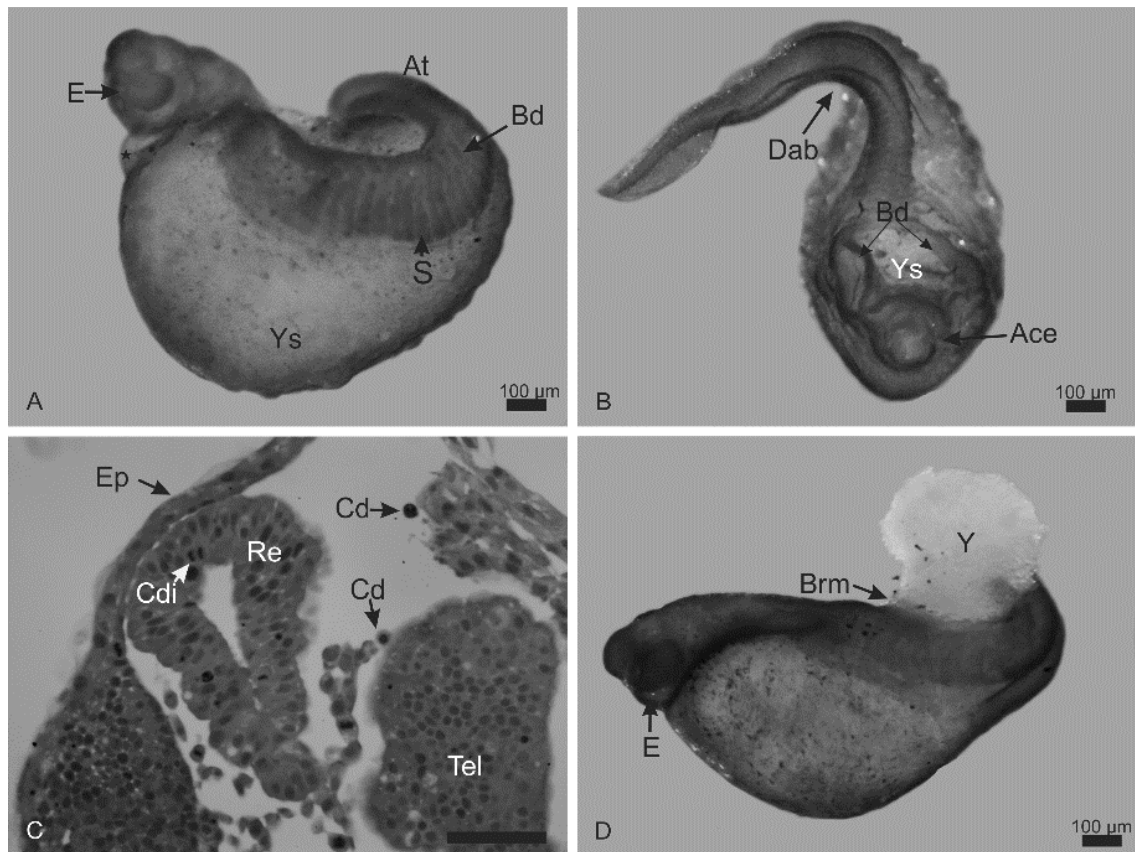
Fonte: Elaboração do próprio autor. A - Anatomia lateral; B – anatomia dorsal embrionária; C - Morfologia dos olhos; D - Morfologia do músculo esquelético. Vesícula ótica - Ot; Placode olfativo - Op; Olho - E; Saco vitelínico - Ys; Somitos - S; nadadeira embrionária - Ef; Sulco neural - Ng; Pregas neurais - Nf; AS - Ausência de somitos; Epitélio - Ep; Retina - Re; Lente - Le; Telencéfalo - Te; Somitos - S; Miosepto - Minha; Mioblasto - Cabeça de seta. Escala: A e B - 200 μ m; C - 50 μ m e D - 20 μ m.

Figura 5.7 - Análise morfológica de *Prochilodus lineatus* após os tratamentos com campos elétricos.



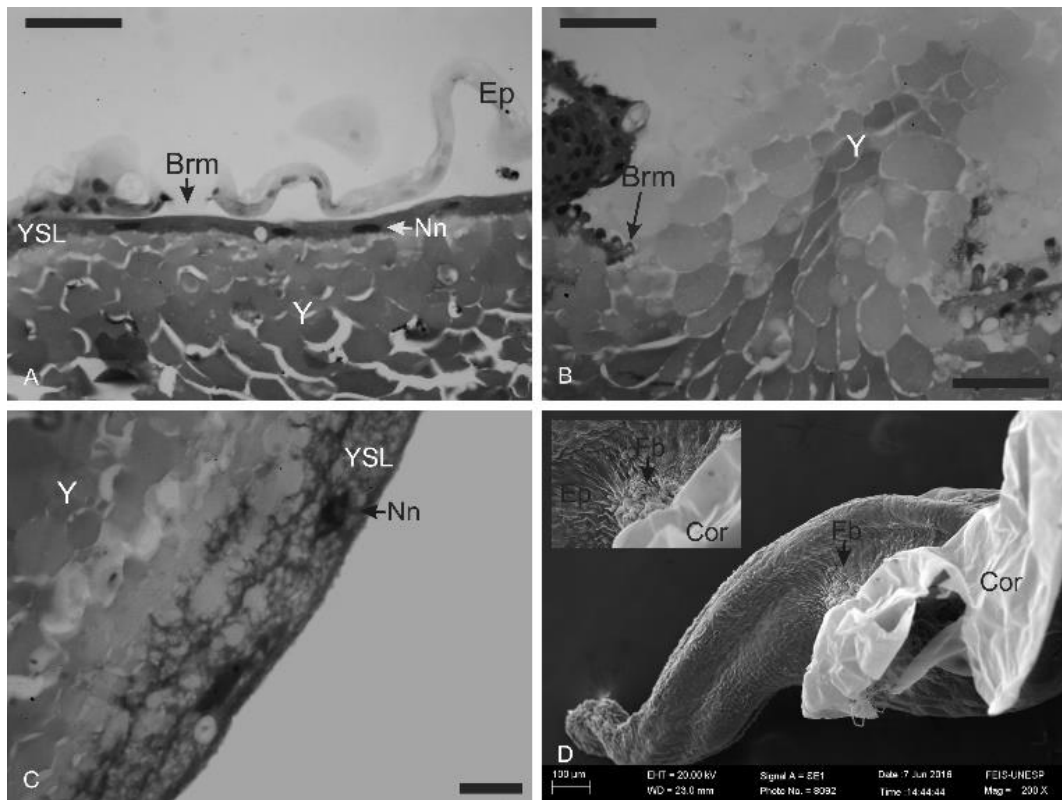
Fonte: Elaboração do próprio autor. A - Camada sincicial de vitelo normal (controle); B - Massa celular sem a presença de somitos (6,9 Joules); C - Músculo esquelético anormal (3,5 Joules); D - Malformação do tubo neural (3,45 Joules). Camada sincicial de vitelo - YSL; Célula epidérmica - Ec; Núcleo normal - Nn; Epitélio - Ep; Saco vitelínico - Ys; Ausência de somitos - As; Morte celular - Cd e Mioblasto - Cabeça de seta; Sulco neural - Ng; Pregas neurais - Nf; Somitos - S. Escala: A - 20 μm e B - 100 μm ; C - 50 μm e D - 100 μm .

Figura 5.8 - Análise histológica de embriões de *Prochilodus lineatus* após os tratamentos com campos elétricos.



Fonte: Elaboração do próprio autor. A - Blastoderme dividida (0,9 Joule); B - Acefalia (1,7 Joule); C - Olho anormal (0,4 Joule); Seção transversais através da cabeça, D); Rompimento da camada sincicial de vitelo e do epitélio de revestimento com escape do vitelo (3,5 J). Olho - E; Somitos -S; Ausência de Cauda - At; Saco vitelínico - Ys; Ângulo dorsal do corpo - Dab; Blastoderme dividida - Bd; Acefalia - Ace; Retina - Re; Divisão celular - Cdi (Anáfase); Morte celular - Cd; Epitélio - Ep; Telencefalo - Te. Rompimento da membrana - Brm; Vitelo - Y. Escala: A e B - 50 μ m; C e D - 20 μ m.

Figura 5.9 - Análise histológica de embriões de *Prochilodus lineatus* após os tratamentos com campos elétricos.



Fonte: Elaboração do próprio autor. A – Rompimento do epitélio; B - rompimento da camada sincicial de vitelo e do epitélio de revestimento com escape do vitelo; C) - camada sincicial de vitelo anormal; D) Fusão entre a membrana coriônica e da epiderme embrionária através da formação de um botão de fusão (inset - fusão) (3,5 Joule). Rompimento da membrana - Brm; Epitélio - Ep; Núcleo normal - Nn; Vitelo – Y; Camada sincicial de vitelo -YSL; Córion - Cor; Botão de fusão - Fb. Escala: A - C - 20µm; D - 200X, inserção - 1000X (MEV).

DISCUSSÃO

A exposição dos embriões ao campo elétrico logo promoveu alterações morfológicas claras, tornando os embriões primeiramente elípticos, posteriormente curvando-os e por fim, em casos mais extremos, rompendo a região da vesícula vitelina. Esse rompimento possivelmente ocorre na região vitelina devido a polaridade dos glóbulos de vitelo (WIEGAND, 1996) associado a uma região celular mais delgada, formada por um sincício celular (YSL) e uma fina epiderme (NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008), sendo assim menos resistente a forças de tração promovidas pela polarização do campo elétrico. Outro ponto associado aqui, é que a exposição da YSL aos campos elétricos, promoveram também a modificação da YSL, tornando-a com aspecto esponjoso e conseqüentemente menos resistente as forças do campo. Explica-se que o rompimento irreversível na membrana plasmática é promovido por uma combinação de altas voltagens e longos períodos de exposição (BENZ; BECKERS; ZIMMERMANN, 1979; CROWLEY, 1973).

Essa deformação morfológica ocorre como resultado da polarização dos íons livres. Ao serem influenciadas pelo campo elétrico, as cargas livres se dividem em cargas negativas e positivas polarizando internamente o embrião e tracionando-o em sentidos opostos (DIMOVA et al., 2007). Em condições normais esse efeito é possível pois a bicamada lipídica é uma ótima barreira a moléculas hidrofílicas, apresentando uma baixa condutância de 10^{-8} Scm^{-2} . Contudo, quando um campo elétrico transmembrana, excede o seu potencial dielétrico a condutância desta membrana aumenta consideravelmente, chegando a 1 Scm^{-2} (BENZ; BECKERS; ZIMMERMANN, 1979; TSONG, 1991), resultando primeiramente na abertura de alguns canais proteicos (+50mV) e posteriormente gerando modificações lipídicas a partir de +70mV (DIMOVA et al., 2009; YOUNG et al., 1982). As alterações morfológicas na membrana lipídica ocorrem em uma larga faixa de voltagem indo de milivolts (mV) a quilovolts (Kv), influenciando o resultado pelo tempo de aplicação. Entretanto, ambos são capazes de gerar resultados semelhantes como a hiperpolarização das membranas biológicas e formação de poros (KORONKIEWICZ; KALINOWSKI, 2004; MARINO; BECKER, 1977; PLIQUETT et al., 2007).

Além da baixa condutância iônica presente nas membranas biológicas, a presença de dois polos elétricos nas mesmas moléculas lipídica é outra característica que possibilita a influência do campo elétrico sobre o material biológico. Essas características permitem a reorganização das moléculas lipídicas sobre um intenso campo elétrico, criando poros

capazes de romper momentaneamente sua barreira osmótica (DIMOVA et al., 2009; KORONKIEWICZ; KALINOWSKI, 2004; TSONG, 1991). Primeiramente, a alteração conformacional das moléculas lipídicas, formam poros hidrofóbicos, sendo posteriormente estruturadas em poros hidrofílicos estáveis capazes de transportar grandes moléculas apolares e fragmentos de DNA (TSONG, 1991; WEAVER; CHIZMADZHEV, 1996).

Ao longo deste trabalho, observou-se uma elevada taxa de anormalidade e mortalidade por rompimento tecidual. Contudo, histologicamente, verificou-se muitas células continuavam a se dividir, em indivíduos anormais, e o corpo embrionário continuava a se desenvolver, porém de forma anômala, possivelmente devido aos danos fisiológicos irreversíveis promovidos pelo tratamento.

Mesmo com graves alterações morfológicas, muitos embriões se mantiveram vivos 12 horas após os tratamentos. Acredita-se, que devido a nutrição das células embrionárias ocorrer por meio de vesículas via camada sincicial de vitelo (D'AMICO; COOPER, 2001), as células não danificadas se manteriam vivas, com capacidade de divisão e até realizar alguns tipos de migrações ou participar da formação de órgãos específicos (normais ou anômalos). Entretanto esses organismos anômalos, não mais possuem a capacidade de desenvolverem um embrião normal, pois as outras áreas danificadas da blastoderme impedem seu funcionamento como uma unidade funcional.

Há possibilidade de os campos elétricos desorganizarem as bicamadas lipídica e alterarem a estrutura do citoesqueleto promovendo o rompimento e a morte celular ocorre, pois, a formação dos poros na membrana (DIMOVA et al., 2007) permitem uma troca iônica entre o meio interno e externo, fazendo com que o potássio intracelular sai, enquanto o sódio entra na célula junto a um influxo de água. Todavia, quando esse influxo de sódio e água não cessa, devido a campos prolongados e elevadas níveis de energia provocamos o inchaço e conseqüente morte celular (KINOSITA; TSONG, 1977; WEAVER; CHIZMADZHEV, 1996). Já o rompimento do citoesqueleto, além de alterar do arcabouço de sustentação do estágio de gastrulação (HOTAMISLIGIL; TONER; POWERS, 1996; JACKIE C. CHENG, ANDREW L. MILLER, 2004), dificultando a formação dos folhetos embrionários e o desenvolvimento de tecidos e órgãos (ZHOU et al., 2014).

Uma das características visualizadas e exclusivas dos tratamentos com campo elétrico foi a presença da fusão da membrana coriônica com a epiderme do embrião. Encontramos em alguns trabalhos na literatura a citação da possibilidade de fusão celular (PLIQUETT et al., 2007; TSONG, 1991), blastômeros (OZIL; MODLINSKI, 1986), oócitos (YAMAHA; YAMAZAKI, 1993) ou vesículas lipídicas (DIMOVA et al., 2007,

2009). Quando estas estruturas são imersas em um campo elétrico, a membrana lipídica pode sofrer um processo de poração, que logo após o final do campo elétrico retorna a seu estado normal fechando os poros, contudo quando existe o contato direto entre duas membranas pode ocorrer a associação das membranas próxima, gerando o processo de fusão (DIMOVA et al., 2007, 2009).

Desta forma, conclui-se que os embriões de *Prochilodus lineatus* resistem aos tratamentos com campo elétrico polarizado, apesar de estimularem o aumento das taxas de anormalidade ao longo do desenvolvimento, podendo tornar-se uma metodologia útil e/ou auxiliar ao processo de criopreservação.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais - CEPTA / ICMBIO, que forneceu os peixes e as instalações utilizadas neste estudo e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, com o apoio financeiro (Processo 2013/02588-5).

Bibliografia

- BARNETT, S. B. et al. Review The sensitivity of biological tissue to ultrasound. **Ultrasound in Med. & Biolin Med. & Biol.**, v. 23, n. 6, p. 805–812, 1997.
- BENZ, R.; BECKERS, F.; ZIMMERMANN, U. Reversible electrical breakdown of lipid bilayer membranes: a charge-pulse relaxation study. **The Journal of membrane biology**, v. 48, n. 2, p. 181–204, 16 jul. 1979.
- COSTER, H. G. L. A quantitative analysis of the voltage-current voltage-current relationships of fixed charge membranes and the associated property of “Punch-Through”. **Biophysical Journal**, v. 5, n. 1962, p. 669–686, 1965.
- CROWLEY, J. M. Bimolecular lipid membranes as an electromechanical instability. **Biophysical Journal**, v. 13, p. 711–724, 1973.
- D’AMICO, L. A.; COOPER, M. S. Morphogenetic domains in the yolk syncytial layer of axiating zebrafish embryos. **Developmental Dynamics**, v. 222, n. 4, p. 611–624, 2001.
- DIMOVA, R. et al. Giant vesicles in electric fields. **Soft Matter**, v. 3, n. 7, p. 817, 2007.
- DIMOVA, R. et al. Vesicles in electric fields: Some novel aspects of membrane behavior. **Soft Matter**, v. 5, n. 17, p. 3201, 2009.

EISMANN, D.; ALENCASTRO, D. Interação de campos elétricos de alta intensidade com membranas biológicas : eletroporação e eletrodeformação. v. 2, n. 4, p. 262–270, 2011.

HAGEDORN, M. et al. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option. **Cryobiology**, v. 49, n. 2, p. 181–9, out. 2004.

HARVEY, B.; KELLEY, R. N.; ASHWOOD-SMITH, M. J. Permeability of intact and dechorionated zebra fish embryos to glycerol and dimethyl sulfoxide. **Cryobiology**, v. 20, n. 4, p. 432–9, ago. 1983.

HOTAMISLIGIL, S.; TONER, M.; POWERS, R. D. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. **Biology of reproduction**, v. 55, n. 1996, p. 161–168, 1996.

HUANG, C.; WHEELDON, L.; THOMPSON, T. E. The Properties of Lipid Bilayer Membranes Separating Two Aqueous Phases : **Journal of Molecular Biology**, v. 8, n. 1, p. 148–160, 1964.

JACKIE C. CHENG, ANDREW L. MILLER, S. E. W. Organization and Function of Microfilaments.pdf. **DEVELOPMENTAL DYNAMICS**, v. 231, p. 313–323, 2004.

JUNG, D. R. et al. Topographical and Physicochemical Modification of Material Surface to Enable Patterning of Living Cells. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 111–154, 2001.

KINOSITA, K.; TSONG, T. Y. O. W. Voltage - induced pore formation and hemolysis of human erythrocytes. **Biochimica et biophysica acta**, v. 471, p. 227–242, 1977.

KORONKIEWICZ, S.; KALINOWSKI, S. Influence of cholesterol on electroporation of bilayer lipid membranes : chronopotentiometric studies. **biochimica et biophysica**, v. 1661, p. 196–203, 2004.

MARINO, A. A.; BECKER, R. O. Biological effects of extremely low frequency. **Physiological Chemistry and Physics**, v. 9, n. 2, 1977.

MASSIP, A. Review Cryopreservation of Embryos of Farm Animals. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, p. 49–55, 2001.

MIR, L. M.; ORLOWSKI, S. Mechanisms of electrochemotherapy ´. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 35, p. 107–118, 1999.

MULDREW, K.; MCGANN, L. E. **Mechanisms of intracellular ice formation.****Biophysical journal**, mar. 1990. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3360586&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

NEUMANN, E. et al. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. **The EMBO Journal**, v. 1, n. 7, p. 841–845, 1982.

NEUMANN, E.; KAKORIN, S. Electrooptics of membrane electroporation and vesicle shape deformation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 1, n. 6, p. 790–799, dez. 1996.

NINHAUS-SILVEIRA, A. et al. Cryogenic preservation of embryos of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote (Cambridge, England)**, v. 17, n. 1, p. 45–55, 2008.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote (Cambridge, England)**, v. 14, n. 3, p. 217–29, ago. 2006.

- OZIL, J.; MODLINSKI, J. A. Effects of electric field on fusion rate and survival of 2-cell rabbit embryos. **Embryol. exp. Morph.**, v. 228, p. 211–228, 1986.
- PETHIG, R. Dielectrophoresis : Using In homogeneous AC Electrical Fields to Separate and Manipulate Cells. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 331–348, 1996.
- PLIQUETT, U. et al. High electrical field effects on cell membranes. **Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)**, v. 70, n. 2, p. 275–82, maio 2007.
- POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, p. 666, 1949.
- RAWSON, D. M. et al. Field emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy studies of the chorion , plasma membrane and syncytial layers of the gastrula-stage embryo of the zebrafish *Brachydanio rerio* : a consideration of the structural and functio. **Aquaculture Research**, p. 325–336, 2000.
- ROBLES, V. et al. Vitrification of turbot embryos: preliminary assays. **Cryobiology**, v. 47, n. 1, p. 30–39, ago. 2003.
- ROBLES, V. et al. Embryo cryopreservation: What we know until now. In: ELSA CABRITA, VANESA ROBLES, P. H. (Ed.). . **Methods in reproductive aquaculture: Marine and Freshwater Species**. New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2009. p. 265–294.
- SALE, A. J. H.; HAMILTON, W. A. Effects of high electric fields on microorganisms: I killing of bacteria and Yeasts. **Biochemical et biophysica ACTA**, v. 148, p. 781–788, 1967.
- SANCHES, E. A. et al. Storage of Steindachneridion parahybae oocytes at different temperatures. **Animal Reproduction Science**, v. 151, n. 3-4, p. 262–268, 2014.
- STREIT-JR, D. P. et al. Cryopreservation of Embryos and Oocytes of South American Fish Species. In: YAMASHIRO, H. (Ed.). . **Recent Advances in Cryopreservation**. [s.l.] InTech, 2014. p. 130.
- SUKHORUKOV, V. L.; MUSSAUER, H.; ZIMMERMANN, U. The Effect of Electrical Deformation Forces on the Electroporation of Erythrocyte Membranes in Low- and High-Conductivity Media. **Journal of Membrane Biology**, v. 163, n. 3, p. 235–245, 1 jun. 1998.
- TER HAAR, G. et al. Ultrasonically induced cavitation in vivo. **The British journal of cancer. Supplement**, v. 5, p. 151–5, 1982.
- TSONG, T. Y. Electroporation of cell membranes. **Biophysical Journal**, v. 60, p. 297–306, 1991.
- VOLDMAN, J. Electrical Forces For Microscale Cell Manipulation. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 8, p. 425–454, 2006.
- WEAVER, J. C.; CHIZMADZHEV, Y. A. Theory of electroporation: A review. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 41, n. 2, p. 135–160, dez. 1996.
- WIEGAND, M. D. Composition , accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish. **Fish Biology and Fisheries** 6, v. 286, p. 259–286, 1996.
- YAMAHA, E.; YAMAZAKI, F. Electrically fused-egg induction and its development in the goldfish, *Carassius auratus*. **The International journal of developmental biology**, v. 37, n. 2, p. 291–8, jun. 1993.
- YASUI, G. S. et al. A sperm cryopreservation protocol for the loach *Misgurnus anguillicaudatus* and its applicability for other related species. **Animal reproduction science**, v. 116, p. 335–345, 2009.

YOUNG, B. Y. J. O. H. N. D. et al. Characterization of a membrane pore-forming protein from entamoeba histolytica. **Exp med**, v. 156, n. December, p. 1677–1690, 1982.

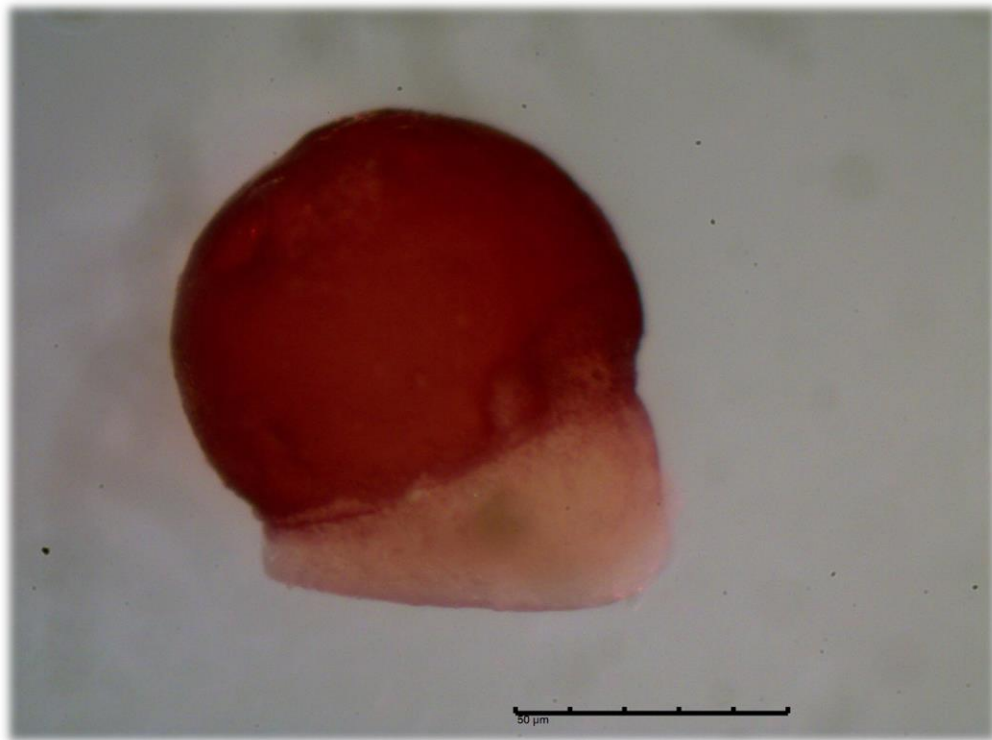
ZHOU, D. et al. Effects of dimethyl sulfoxide on asymmetric division and cytokinesis in mouse oocytes. p. 1–7, 2014.

ZIMMERMANN, U. et al. Effects of External Electrical Fields on Cell Membranes. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 83, p. 58–83, 1976.

ZIMMERMANN, U. et al. Electromanipulation of Mammalian Cells : Fundamentals and Application. **IEEE TRANSACTIONS ON PLASMA SCIENCE**, v. 28, n. 1, p. 72–82, 2000.

CAPÍTULO 6

Vitrificação embrionária de *Prochilodus lineatus* utilizando solução de 1,2-Propanediol (6M) associada ao campo ultra-sônico e ao campo elétrico polarizado.



Raphael da Silva Costa

Vitrificação embrionária de *Prochilodus lineatus* utilizando solução de 1,2-Propanediol (6M) associada ao campo ultra-sônico e ao campo elétrico polarizado.

Raphael da Silva Costa ^{a,c}, Fabrício Marçal Silva de Souza ^a, José Augusto Senhorini ^b,
Cristiane Bashiyo-Silva^a, Rosicleire Verissimo Silveira ^a, Alexandre Ninhaus-Silveira ^{a*}.

^a Laboratório de Ictiologia Neotropical – LINEO, Depto de Biologia e Zootecnia, FEIS/UNESP –
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Avenue Brasil, 56, 15085-000, Ilha Solteira, São
Paulo, Brazil. Phone: +55 018 37431285, Fax: +55 018 37422140

^b Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais at Instituto Chico Mendes da
Conservação de Biodiversidade – CEPTA/ICMBio, Pirassununga, São Paulo, Brazil

^c Pós-Graduação em Biologia Animal, IBILCE/UNESP/Campus de São José do Rio Preto, São Paulo,
Brazil

* Corresponding author. Tel: +551837431285; Fax: +551837422140

E-mail address: ninhaus@bio.feis.unesp.br

Resumo

A criopreservação de sêmen já é uma técnica bem estabelecida para várias espécies de peixes, entretanto a criogenia de oócitos e embriões ainda é um importante objetivo a ser alcançado para várias classes de organismos, inclusive para os peixes. Nesse sentido este trabalho teve como objetivos testar o uso do ultrassom e campos elétricos polarizados, como forma de aumentar a permeabilidade embrionária ao crioprotetor, favorecendo o processo de criopreservação (vitrificação). Para tal, foram utilizados embriões de *Prochilodus lineatus* (Estágio de Gastrulação) e, como substância crioprotetora, 1,2-Propanediol (Prop). Para facilitar a permeabilização foram testados ultrassom (1,2 Joule) e campo elétrico polarizado (0,4 e 1,7 Joule). Os embriões foram expostos a soluções em osmolaridade crescente de Prop até 6M, quando foram submetidos ao campo acústico (16Hz, duty de 50%, 0,8W/1,12 joule) ou a um dos campos elétricos [0,4 Joule (3,1mA e 19V) e 1.7 Joule (5,9mA e 39,2V)]. Por fim, os embriões foram imediatamente mergulhados no nitrogênio líquido e armazenados por em botijões criogênicos (MVE, XC20). Após dois meses, o material foi descongelado submergindo-o em água a temperatura de 30°C e à temperatura ambiente (27°C±1,2°C). Nenhum dos protocolos possibilitou a sobrevivência embrionária. Contudo, todos tratamentos foram eficientes na formação de um sólido vítreo, possuindo como alterações a presença de algumas trincas e a existência de uma zona de dilatação. A nucleação e o crescimento de cristais de gelo ocorreram apenas no descongelamento das amostras. Após o descongelamento, foram detectadas várias alterações estruturais como rompimento tecidual, escape de vitelo, perda do contato entre a blastoderme e a camada sincicial de vitelo (YSL), fissuras teciduais, presença de dobras na blastoderme e inúmeros espaços intercelular. Assim, conclui-se que apesar de todos os protocolos para infiltração e vitrificação dos embriões de *P. lineatus* ocorrerem de forma eficaz, as metodologias de descongelamento utilizadas possibilitaram a formação de cristais de gelo durante o aquecimento. Esses dados poderão auxiliar no desenvolvimento de pesquisas criopreservação de embriões de peixes e de outras espécies com características embrionárias semelhantes.

Palavras-Chave: Toxicidade, Crioprotetores, Embriões, Gástrula, Biotecnologia.

Introdução

A criopreservação é uma técnica que teve seu primeiro sucesso descrito em 1949 com espermatozoides de coelho imersos em solução de glicerol (POLGE; SMITH; PARKES, 1949). Com peixes, essa metodologia iniciou seus estudos em 1953 buscando criopreservar espermatozoides e oócitos de *Clupea harengus* a -79°C (BLAXTER, 1953), também utilizando o glicerol como crioprotetor. Até os dias de hoje, esta biotecnologia é estabelecida apenas para espermatozoides (VIVEIROS; GODINHO, 2009; YASUI et al., 2009) e blastômeros (LIN et al., 2009; MARINA et al., 2002; STRUSSMANN et al., 1999; YASUI et al., 2011), mantendo-se inviável ainda para oócitos e embriões.

Isso ocorre, pois em peixes seus embriões são complexos sistemas biológicos estruturados por diferentes compartimentos com osmolaridade específicas, constituindo grandes barreiras à difusão de químicos durante o processo de crioconservação. Associado a isso, sua anatomia compõe um corpo de baixa relação área/volume, dificultando ainda mais essa metodologia (JARAMILLO et al., 2012; ROBLES et al., 2009). Desta forma, a criopreservação exige novas abordagens que resultem em novas diretrizes para o congelamento.

O ultrassom é uma técnica que permite o aumento da permeabilidade dos tecidos biológicos, sendo muito empregado nas áreas médicas e fisioterápicas (sonoforese) (BAKER; ROBERTSON; DUCK, 2001; SPEED, 2001) como metodologia para aumentar a permeabilidade das membranas celulares aos medicamentos (BOUCAUD et al., 2002; JOHNS, 2002; WANG et al., 2008). Essa técnica é uma modalidade de energia sonora longitudinal, de penetração profunda, que, ao ser transmitida aos tecidos biológicos, é capaz de produzir alterações celulares por efeitos mecânicos (KRASOVITSKI et al., 2011). As ondas de ultrassom são originadas por um cristal piezoelétrico que ao receber descargas elétricas (BAKER; ROBERTSON; DUCK, 2001), modificam suas dimensões promovendo a expansão e compressão da matéria no seu entorno, resultando na vibração molecular. Sequências destes ciclos formam ondas mecânicas que transmitem sua energia através do meio (KRASOVITSKI et al., 2011; KUMARESAN et al., 2011; MARTINEZ et al., 2011; MITRAGOTRI; KOST, 2004). Essa metodologia tem a capacidade de realizar a transdução de medicamentos, sendo uma possível ferramenta para a baixa permeabilidade encontrada em embriões de peixes.

Outra metodologia utilizada com a finalidade de aumento da permeabilidade é a eletroporação. Essa metodologia permite aumentar a permeabilidade das células e tecidos

promovendo uma perturbação estrutural dos folhetos lipídicos das membranas celulares, como consequência da aplicação de pulsos elétricos (EISMANN; ALENCASTRO, 2011; NEUMANN; KAKORIN, 1996; WEAVER; CHIZMADZHEV, 1996). O aumento da permeabilidade por essa técnica, resulta da interação entre o dipolo resultante de uma partícula e o gradiente espacial do campo elétrico (PETHIG, 1996). Assim, quando uma célula ou outra partícula polarizada, são colocadas em um campo elétrico, suas cargas livres são induzidas a se separarem, formando dois polos (dipolo elétrico) de forças opostas e com intensidades iguais (VOLDMAN, 2006). Essa mudança, faz com que os polos gerem forças opostas de tensão promovendo uma deformação morfológica transitória (BENZ; BECKERS; ZIMMERMANN, 1979; SUKHORUKOV; MUSSAUER; ZIMMERMANN, 1998; ZIMMERMANN et al., 1976).

Contudo, quando a força do campo elétrico atinge níveis adequados, as membranas podem sofrer a formação de poros (ZIMMERMANN et al., 2000). Junto a formação do dipolo, as cargas livres, associadas a semipermeabilidade das membranas, promovem o acúmulo de cargas opostas entre o meio intra e extracelular, resultando no aumento da diferença de potencial ali existente (d.d.p.). Essa d.d.p. tende a aumentar até atingir o limite da rigidez dielétrica das membranas, no entorno de 1V (NEUMANN et al., 1982; SALE; HAMILTON, 1967), formando após isso, poros transitórios que tanto reduzem essa ddp ao permitem o fluxo de íons, quanto possibilitam o escape de metabólitos, o aumento da captação de drogas, sondas moleculares e DNA pelas células (VOLDMAN, 2006), sendo os efeitos dos campo elétrico diretamente influenciado pela constituição lipídica das membranas (HUANG; WHEELDON; THOMPSON, 1964).

Assim objetiva-se neste trabalho promover a vitrificação e o aquecimento de embriões de *Prochilodus lineatus*, no estágio de gastrulação, utilizando a solução de 1,2-Propanediol 6M associado ao ultrassom (1,2 Joule) e campo elétrico polarizado (0,4 e 1,7 Joule).

Material e métodos

Embriões

O manejo dos reprodutores e a obtenção dos embriões ocorreram conforme a descrição do capítulo 1.

Vitrificação

Embriões com características normais de desenvolvimento, foram selecionados e submetidos a uma série de 4 banhos de 5 minutos, por imersão em solução embrionária (12mM NaCl + 1mM KCl + 1,5 CaCl₂ + 1,5mM MgCl₂) contendo osmolaridade crescente de 1.2-Propanediol (0,75 – 1,5 – 3 – 6M).

Nas avaliações com ultrassom, os embriões foram submetidos, nos 60 segundos finais de imersão em solução de PROP-6M, ao campo acústico fornecendo 1,12J/cm² de energia temporal (frequência de 16Hz, duty de 50% e potência de 0,8W). Enquanto que para o campo elétrico, os embriões foram submetidos nos 15 segundos finais de imersão na solução de PROP 6M, a dois campos elétrico polarizado descontínuo (50%) um fornecendo 0.4 Joule de energia (3,1mA e 19V) e o segundo fornecendo 1,7 Joule de energia (5,9mA e 39,2V). Adotou-se como controle experimental, embriões vitrificados apenas com a solução crioprotetora.

A escolha do crioprotetor e a seleção dos parâmetros de ultrassom e campo elétrico, foram definidos em estudos prévios. No fim, os embriões foram vitrificados em nitrogênio líquido, utilizando o “embryo’s cryotube”, dispositivo desenvolvido por nós que permite acondicionar um embrião em uma lâmina de solução com volume igual a 10µl, sendo posteriormente depositados em botijão criogênico (MVE, XC20) e mantidos sob condições adequadas no Laboratório de Ictiologia Neotropical por um período de 2 meses.

Desvitrificação

Os procedimentos para a desvitrificação das amostras ocorreram conforme a descrição do capítulo 3.

Estereomicroscopia

Os procedimentos para coloração e análises ocorreram conforme a descrição do capítulo 2.

Histologia.

Os procedimentos para fixação, microtomia e coloração ocorreram conforme a descrição do capítulo 2.

Resultados

Todos tratamentos permitiram a formação de um sólido vítreo, sem a presença de regiões brancas, indicativas da nucleação dos cristais de gelo. As alterações encontradas na formação do sólido vítreo foram a presença de trincas em algumas tentativas (Figura 6.1 A) e a existência de uma zona de dilatação central comum a todas tentativas (Figura 6.1 B), que não atinge o embrião.

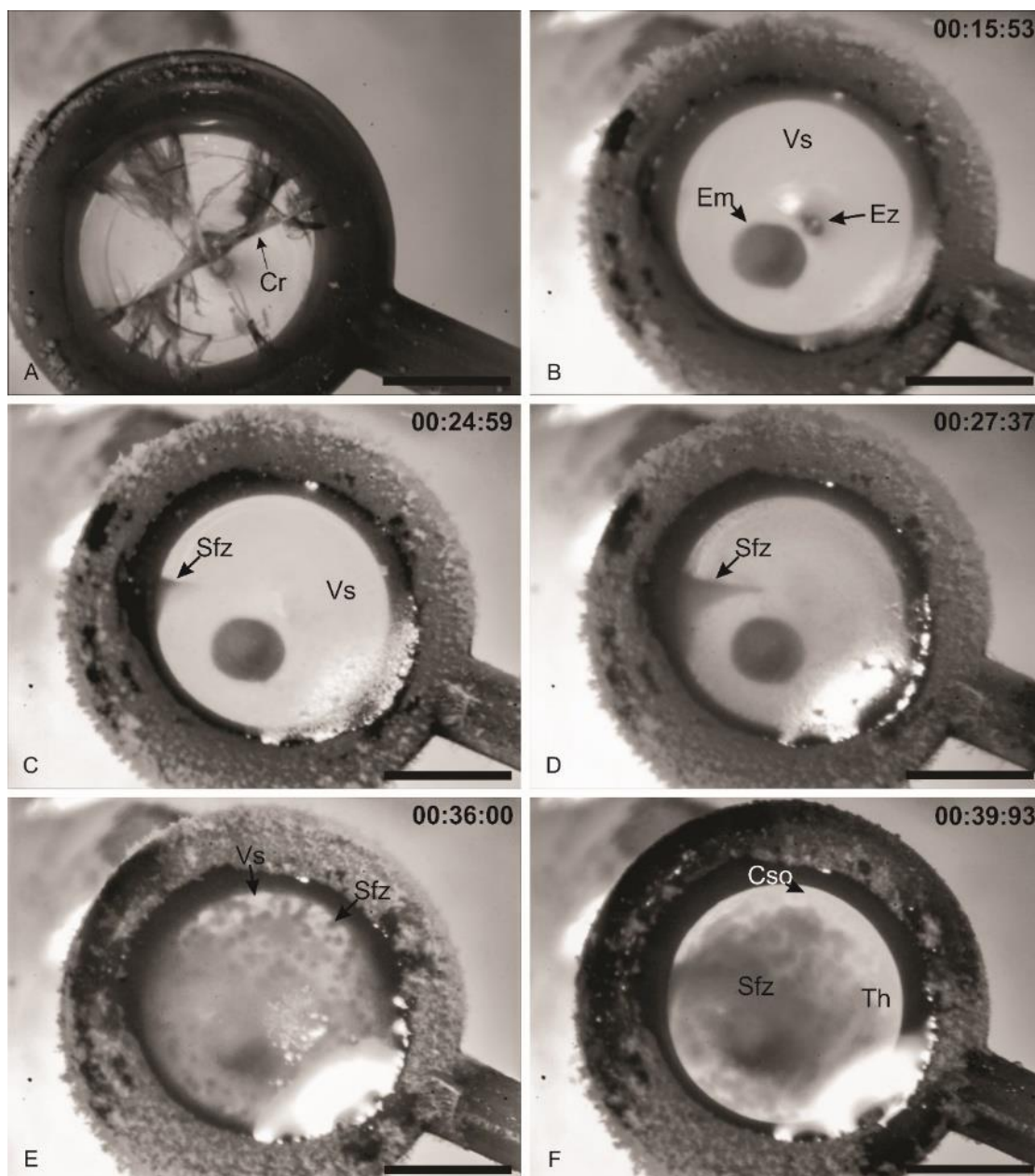
Contudo, apesar do sucesso na vitrificação, o processo de aquecimento gerou problemas. Essa etapa permitiu a nucleação e o crescimento dos cristais de gelo (Figuras 6.1 C-E), pois ao ganhar calor, o material sai de seu estado vítreo, desenvolvendo regiões com maior densidade e de coloração mais branca (Figura 6.1 E). Somente após o congelamento do sólido vítreo iniciou-se a liquefação do sólido (Figura 6.1 F).

Os embriões controle, vitrificados em solução de Prop 6M, resultou em severas anormalidades, quando comparada aos embriões in natura (Figuras 6.2 A – B). Dentre elas, o rompimento tecidual da região vitelina, levando ao escape de vitelino (Figura 6.2 C) é muito frequente. O contato entre a blastoderme e a YSL (Figura 6.2 B) foi perdida em algumas regiões embrionárias, facilitando a formação de dobras teciduais (Figura 6.2 D), que ainda podem ser agravadas por fissuras (Figura 6.2 E) nos tecidos. Em sua blastoderme foi possível observar regiões em que a quebra da coesão tecidual ocorreu, formando inúmeros e dilatadas espaços entre as células dos tecidos (Figura 6.2 F).

Nenhum dos protocolos possibilitaram a sobrevivência embrionária de *Prochilodus lineatus*. Ao associar o ultrassom a vitrificação, a morfologia normal do estágio de gastrulação (Figura 6.2 A, 6.3A), sofreu alterações graves, como rompimento tecidual com extravasamento de vitelo (Figura 6.3 B), fissuras (Figura 6.3 C) e observou-se presença de bolhas epidérmicas.

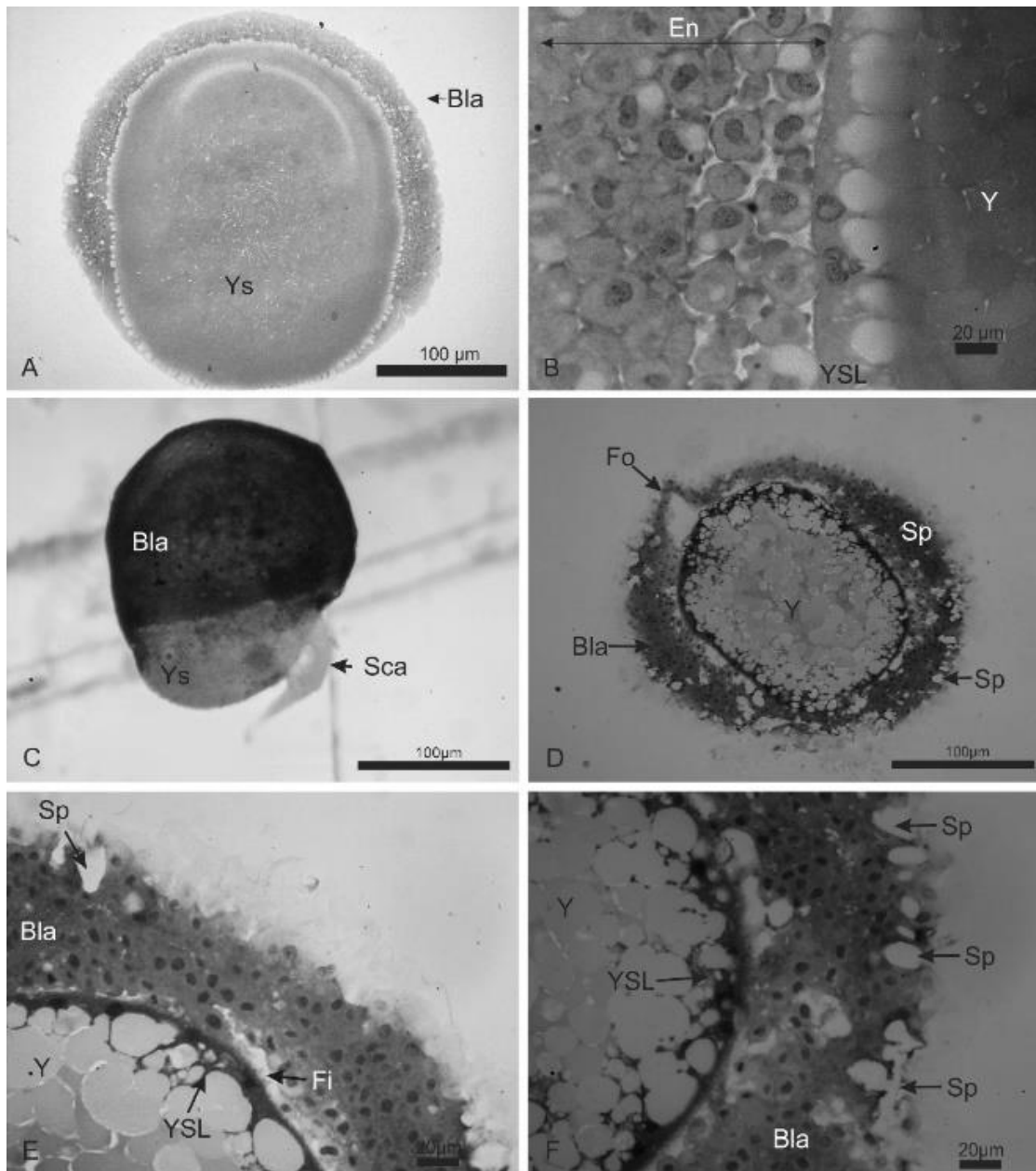
Semelhante aos descritos acima, os embriões submetidos ao campo elétrico, também possuíam membranas rompidas na região vitelina, resultando no extravasamento do vitelo (Figura 6.3 D), fissuras (Figura 6.3 D) e rompimento tecidual. O processo de campo elétrico, fornecendo 1,7Joule de energia, promoveu a desconfiguração da região vitelina, que se tornou na região periférica uma massa única gerando um embrião com “formato de caracol” ao apresentar seu polo vegetal achatado (Figura 6.3 E). Observou-se também embriões portando fissuras em sua blastoderme e uma YSL com espaços anormais (Figura 6.3 F).

Figura 6.1 - Racristalização na solução de 1,2-propanodiol [6M].



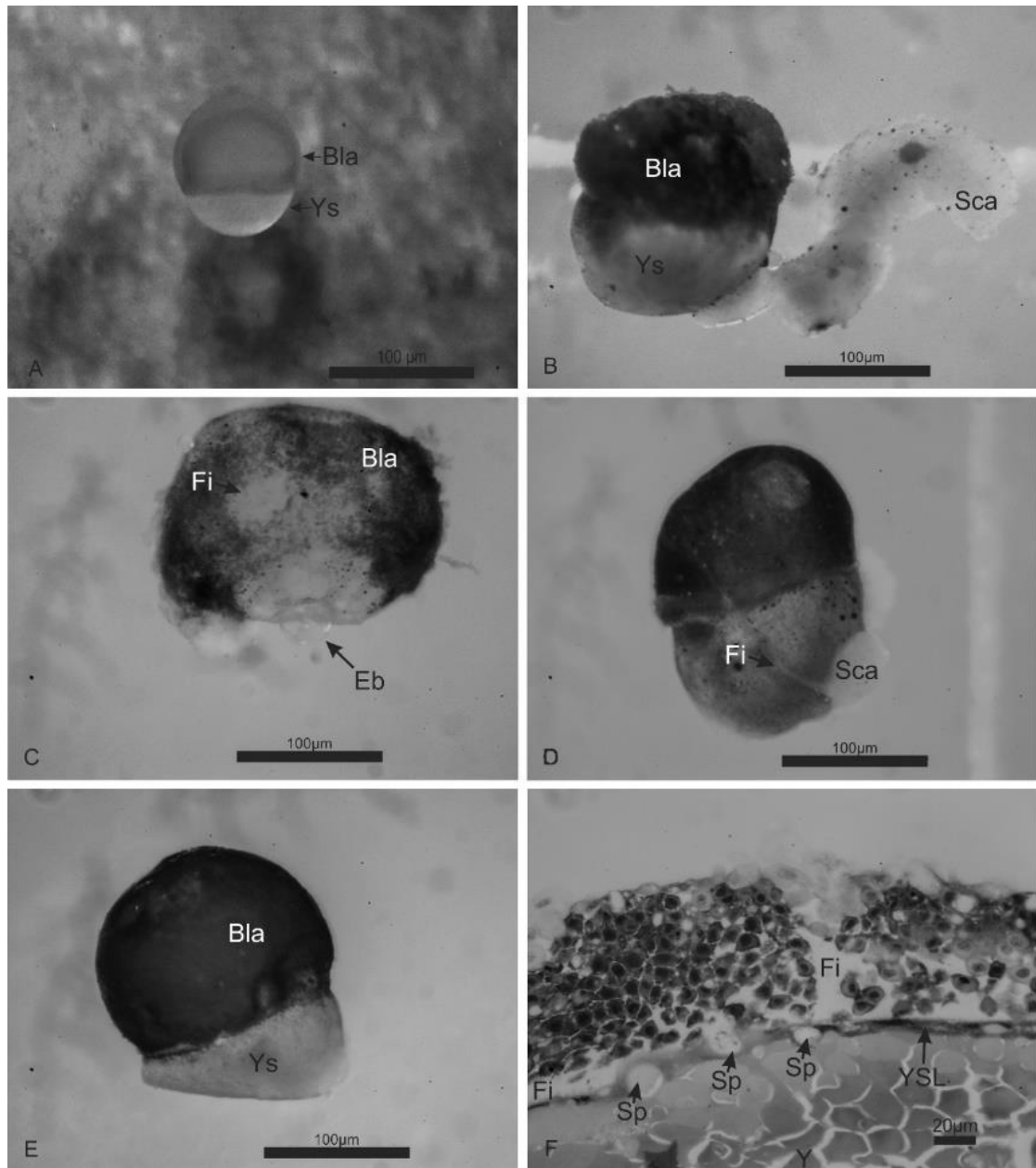
Fonte: Elaboração do próprio autor. A - Rachaduras no sólido vítreo. B - Crioprotetor vitrificado e embrião. C e D - Congelamento do sólido vítreo. E - Solução crioprotetora congelada com duas densidades diferentes. F - Liquefação do sólido. Canto superior esquerdo - Tempo (segundos). Sólido vítreo - Vs; Embrião - Em; Zona de expansão -Ez; Sólido congelado - Sfz; Solução crioprotetora - Cso e Aquecimento - Th. Tempo de descongelamento: 43 ± 5 segundos. Escala: A - F - 1,5 mm.

Figura 6.2 - Efeitos da vitrificação e descongelamento sobre os embriões de *Prochilodus lineatus*.



Fonte: Elaboração do próprio autor. (12mM NaCl + 1mM KCl + 1,5 CaCl₂ + 1,5mM MgCl₂). A e B – Controle; D a F – Embriões vitrificados em solução embrionária: Saco vitelínico - Ys; Blastoderme – Bla; Endoderme – En; Vitelo – Y; Espaço intercellular – Sp; Camada sincial de vitelo -YSL; Folds – Fo; Fissure – Fi. Escala: A, C e D 100 μm; B, E – F 20 μm.

Figura 6.3 - Vitrificação e descongelamento de embriões de *Prochilodus lineatus* após os tratamentos de ultrassom e campo elétrico polarizado.



Fonte: Elaboração do próprio autor. A- Controle; B a C - Tratados com ultrassom [1,2 Joule]; D a F - Tratados com Campo elétrico polarizado [0,4 e 1,7 Joule]. Saco vitelínico - Ys; Blastoderme - Bla; Vitelo - Y; Espaço intercelular - Sp; Camada sincicial de vitelo -YSL; Fissure - Fi. Escala: A- E 100 μm; F 20 μm.

Discussão

Os tratamentos utilizando 1,2-Propanediol foram efetivos na vitrificação embrionária, sendo o surgimento das trincas possivelmente promovidas por variações de calor, uma vez que em sua maioria, ocorria ao envasar os embriões já vitrificados no tubo para armazenamento. Este crioprotetor havia sido descrito como uma substância capaz de promover a formação vítrea em pequenas porções (MEHL; BOUTRON, 1987), contudo, diferentemente do descrito aqui, essa vitrificação ocorria com o químico em solução de alta osmolaridade, resultado da mistura com metanol e dimetilsulfóxido (KIRICHEK et al., 2016).

Poliálcoois, como no caso o 1,2-propanediol, são produtos que possuem baixa toxidez que realizam fortes pontes de hidrogênio com as moléculas de água, perturbando a cinética de formação dos cristais de gelo (MEHL; BOUTRON, 1987). Sendo relevante descrever que durante o aquecimento, primeiramente desaparecia-se as trincas na região de dilatação, e somente depois iniciava o congelamento da amostra, seguido por sua liquefação; o que corrobora com dados, que há muito já descritos na literatura como o sólido amorfo se desvitrificando para seu posterior descongelamento (BOUTRON; KAUFMANN, 1978; MEHL; BOUTRON, 1987). Um dos problemas encontrados é que a curva necessária para a transformação de um sólido vítreo em líquido, sem que ocorra a nucleação e o crescimento dos cristais de gelo, não são atingíveis facilmente. Comprova-se com oócitos de rato que, quando maior a curva de aquecimento menos injúrias são verificadas (SEKI; MAZUR, 2012; WOLFE; BRYANT, 2001).

As interações que ocorrem durante o congelamento e descongelamento são complexas, sendo dois os fatores mais relacionados as injúrias. O primeiro é a alteração das propriedades das soluções, que devido a desidratação do material biológico e o aumento da concentração iônica na fração não congelada promove danos osmóticos irreversíveis. O segundo, está relacionado com a formação de gelo intracelular, que ocorre quando o resfriamento ou aquecimento é lento demais, permitindo tanto o rearranjo das ligações entre as moléculas de água, quando alterações nos ângulos entre átomos de hidrogênio, promovendo a nucleação, crescimento e expansão dos cristais de gelo (HAGEDORN et al., 2004; MULDREW; MCGANN, 1990). Em sua maioria, os danos encontrados aqui foram semelhantes nos dois tratamentos, sendo uma exceção apenas a alteração na conformação

do vitelo nos tratamentos com o campo elétrico, gerando embriões com formato de “Caracol”.

O escape do vitelo, normalmente ocorreu na região vitelina, mais precisamente na região do blastóporo, isso se deve, pois, o processo de congelamento promove uma alteração na YSL e epitélio de revestimento, facilitando seu rompimento. Uma das possíveis causas dessa anomalia é a degradação do citoesqueleto provocada tanto pelos crioprotetores (HOTAMISLIGIL; TONER; POWERS, 1996) quanto pelo próprio choque térmico (FARRANT; MORRIS, 1973; PAULA et al., 2014).

Outro ponto importante, diz respeito a grande quantidade de espaços anômalos presentes na blastoderme. Estes espaços surgem devido à má desidratação e/ou penetração do crioprotetor permitindo regiões com uma quantidade considerável de água, que ao congelar, possibilita a formação de cristais de gelo que ao expandir rompe de forma irreversível os tecidos biológicos (HAGEDORN et al., 2004; PEGG, 2010; RUBINSKY; PEGG, 1988). Junto a isso, a capacidade de dilatação da região vitelina e da blastoderme são diferentes, o que possivelmente causou a perda da coesão entre a blastoderme e YSL (WOLFE; BRYANT, 2001).

A associação do campo de ultra-sônico e do campo elétrico não alteraram os resultados obtidos em outros relatos de criopreservação embrionária, encontrados na literatura (EL-BATTAWY; LINHART, 2009; HAGEDORN et al., 2002, 2004; LIU; ZHANG; RAWSON, 1999; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008). A impossibilidade de desvitrificar o embrião, sem a recristalização, impede a avaliação dos efeitos reais de ambas tecnologias, uma vez que o crescimento dos cristais de gelo rompe os tecidos inviabilizando a formação de um organismo íntegro.

Assim conclui-se que as metodologias utilizadas não permitiram avaliar os efeitos do ultrassom e campo elétrico polarizado, uma vez que a ocorrência da recristalização ao longo do processo de descongelamento danificou as estruturas embrionárias. Assim necessitamos de maiores estudos sobre o uso do ultrassom e campo elétrico polarizado e metodologias que busquem uma curva de descongelamento mais eficaz.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais - CEPTA / ICMBIO, que forneceu os peixes e as instalações utilizadas neste estudo e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, com o apoio financeiro (Processo 2013/02588-5).

Bibliografia

BAKER, K. G.; ROBERTSON, V. J.; DUCK, F. A. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. **Physical therapy**, v. 81, n. 7, p. 1351–8, jul. 2001.

BENZ, R.; BECKERS, F.; ZIMMERMANN, U. Reversible electrical breakdown of lipid bilayer membranes: a charge-pulse relaxation study. **The Journal of membrane biology**, v. 48, n. 2, p. 181–204, 16 jul. 1979.

BLAXTER, J. H. S. Sperm Storage and Cross-Fertilization of Spring and Autumn Spawning Herring. **Nature**, v. 172, p. 1189–1190, 1953.

BOUCAUD, A. et al. Effect of sonication parameters on transdermal delivery of insulin to hairless rats. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, v. 81, n. 1-2, p. 113–9, 17 maio 2002.

BOUTRON, P.; KAUFMANN, A. Stability of the Amorphous State in the System Water-Glycerol-Dimethylsulfoxide. **Cryobiology**, v. 108, p. 93–108, 1978.

EISMANN, D.; ALENCASTRO, D. Interação de campos elétricos de alta intensidade com membranas biológicas : eletroporação e eletrodeformação. v. 2, n. 4, p. 262–270, 2011.

EL-BATTAWY, K. A.; LINHART, O. Preliminary studies on cryopreservation of common tench (*Tinca tinca*) embryos (work in progress). **Reproduction in domestic animals**, v. 44, n. 4, p. 718–723, ago. 2009.

FARRANT, J.; MORRIS, G. J. Thermal Shock and Dilution of Freezing Shock as the Causes Injury. **Cryobiology**, v. 140, p. 134–140, 1973.

HAGEDORN, M. et al. Altering Fish Embryos with Aquaporin-3: An Essential Step Toward Successful Cryopreservation. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 3, p. 961–966, 1 set. 2002.

HAGEDORN, M. et al. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option. **Cryobiology**, v. 49, n. 2, p. 181–9, out. 2004.

HOTAMISLIGIL, S.; TONER, M.; POWERS, R. D. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. **Biology of reproduction**, v. 55, n. 1996, p. 161–168, 1996.

HUANG, C.; WHEELDON, L.; THOMPSON, T. E. The Properties of Lipid Bilayer Membranes Separating Two Aqueous Phases: **Journal of Molecular Biology**, v. 8, n. 1, p. 148–160, 1964.

- JARAMILLO, R. et al. Caracterización electroforética de las proteínas del corion normal Electrophoretic characterization for both normal and hard chorion proteins of *Salmo salar*. **medicina veterinaria**, v. 65, p. 59–65, 2012.
- JOHNS, L. D. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: The frequency resonance hypothesis. **Journal of Athletic Training**, v. 37, n. 3, p. 293–299, 2002.
- KIRICHEK, O. et al. Segregated water observed in a putative fish embryo cryopreservative. **Royal Society Open Science**, v. 3, n. 3, p. 150655, 2016.
- KRASOVITSKI, B. et al. Intramembrane cavitation as a unifying mechanism for ultrasound-induced bioeffects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 8, p. 3258–3263, 2011.
- KUMARESAN, A et al. Cryopreservation-induced alterations in protein tyrosine phosphorylation of spermatozoa from different portions of the boar ejaculate. **Cryobiology**, v. 63, n. 3, p. 137–44, dez. 2011.
- LIN, C. et al. Effect of chilling and cryopreservation on expression of Pax genes in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and blastomeres. **Cryobiology**, v. 59, n. 1, p. 42–7, ago. 2009.
- LIU, X.; ZHANG, T.; RAWSON, D. The effect of partial removal of yolk on the chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Cryobiology**, v. 39, n. 3, p. 236–42, nov. 1999.
- MARINA, P. et al. Fine structure of leydig and sertoli cells in the testis of immature and mature spotted ray *Torpedo marmorata*. **Molecular reproduction and development**, v. 63, n. 2, p. 192–201, out. 2002.
- MARTINEZ DE ALBORNOZ, P. et al. The evidence of low-intensity pulsed ultrasound for in vitro, animal and human fracture healing. **British medical bulletin**, v. 100, p. 39–57, jan. 2011.
- MEHL, P.; BOUTRON, P. Glass-forming tendency and stability of the amorphous state in the aqueous solutions of linear polyalcohols with four carbons. II. Ternary systems with water, 1,2-propanediol or 1,3-butanediol or 2,3-butanediol. **Cryobiology**, v. 24, n. 4, p. 355–367, 1987.
- MITRAGOTRI, S.; KOST, J. Low-frequency sonophoresis: a review. **Advanced drug delivery reviews**, v. 56, n. 5, p. 589–601, 27 mar. 2004.
- MULDREW, K.; MCGANN, L. E. **Mechanisms of intracellular ice formation.** **Biophysical journal**, mar. 1990. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3360586&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>
- NEUMANN, E. et al. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. **The EMBO Journal**, v. 1, n. 7, p. 841–845, 1982.
- NEUMANN, E.; KAKORIN, S. Electrooptics of membrane electroporation and vesicle shape deformation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 1, n. 6, p. 790–799, dez. 1996.
- NINHAUS-SILVEIRA, A. et al. Cryogenic preservation of embryos of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote (Cambridge, England)**, v. 17, n. 1, p. 45–55, 2008.
- NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote (Cambridge, England)**, v. 14, n. 3, p. 217–29, ago. 2006.
- PAULA, D. A. J. et al. Toxicity of cryoprotectants on *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837) (curimba) embryos in an experimental incubator (Characiformes: Prochilodontidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 12, n. 4, p. 835–844, 2014.

PEGG, D. E. Cryobiology The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs q. v. 60, p. 36–44, 2010.

PETHIG, R. Dielectrophoresis : Using In homogeneous AC Electrical Fields to Separate and Manipulate Cells. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 331–348, 1996.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, p. 666, 1949.

ROBLES, V. et al. Embryo cryopreservation: What we know until now. In: ELSA CABRITA, VANESA ROBLES, P. H. (Ed.). **Methods in reproductive aquaculture: Marine and Freshwater Species**. New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2009. p. 265–294.

RUBINSKY, B.; PEGG, D. E. A mathematical model for the freezing process in biological tissue. **Proceedings of the Royal Society of London.**, v. 234, n. 1276, p. 343–58, 23 ago. 1988.

SALE, A. J. H.; HAMILTON, W. A. Effects of high electric fields on microorganisms: I killing of bacteria and Yeasts. **Biochimica et biophysica ACTA**, v. 148, p. 781–788, 1967.

SEKI, S.; MAZUR, P. Ultra-rapid warming yields high survival of mouse oocytes cooled to -196°C in dilutions of a standard vitrification solution. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e36058, jan. 2012.

SPEED, C. A. Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 40, n. 12, p. 1331–6, dez. 2001.

STRUSSMANN, C. et al. Cryopreservation of isolated fish blastomeres: effects of cell stage, cryoprotectant concentration, and cooling rate on postthawing survival. **Cryobiology**, v. 39, n. 3, p. 252–61, nov. 1999.

SUKHORUKOV, V. L.; MUSSAUER, H.; ZIMMERMANN, U. The Effect of Electrical Deformation Forces on the Electroporation of Erythrocyte Membranes in Low- and High-Conductivity Media. **Journal of Membrane Biology**, v. 163, n. 3, p. 235–245, 1 jun. 1998.

VIVEIROS, A T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish physiology and biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 137–50, mar. 2009.

VOLDMAN, J. Electrical Forces For Microscale Cell Manipulation. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 8, p. 425–454, 2006.

WANG, R. Y. et al. Ultrasound enhanced methanol penetration of zebrafish (*Danio rerio*) embryos measured by permittivity changes using impedance spectroscopy. **European Biophysics Journal**, v. 37, n. 6, p. 1039–1044, 2008.

WEAVER, J. C.; CHIZMADZHEV, Y. A. Theory of electroporation: A review. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 41, n. 2, p. 135–160, dez. 1996.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, v. 24, p. 438–450, 2001.

YASUI, G. S. et al. A sperm cryopreservation protocol for the loach *Misgurnus anguillicaudatus* and its applicability for other related species. **Animal reproduction science**, v. 116, p. 335–345, 2009.

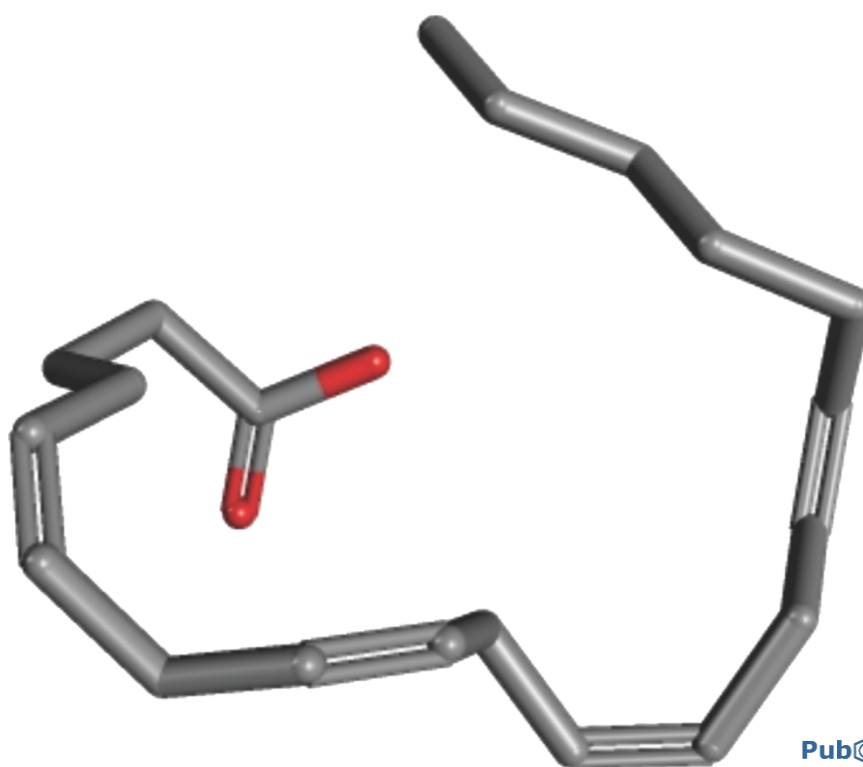
YASUI, G. S. et al. Production of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) germ-line chimera using transplantation of primordial germ cells isolated from cryopreserved blastomeres. **Journal of animal science**, v. 89, n. 8, p. 2380–8, ago. 2011.

ZIMMERMANN, U. et al. Effects of External Electrical Fields on Cell Membranes. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 83, p. 58–83, 1976.

ZIMMERMANN, U. et al. Electromanipulation of Mammalian Cells : Fundamentals and Application. **IEEE TRANSACTIONS ON PLASMA SCIENCE**, v. 28, n. 1, p. 72–82, 2000.

CAPÍTULO 7

Fatty acids influence in *Prochilodus lineatus* embryo cryopreservation parameters.



PubChem

Arachidonic acid

$C_{20}H_{32}O_2$

Raphael da Silva Costa

Running head: Changes of fatty acid composition of embryos

Fatty acids influence in *Prochilodus lineatus* embryo cryopreservation parameters

R. S. Costa*, F. M. S. Souza*, J. A. Senhorini†, C. Bashiy-Silva*, G. C. Z. Coelho§, D. H. S. Silva‡, R.V. Silveira*, C. S. Ribeiro§ and A. Ninhaus-Silveira*

* Laboratório de Ictiologia Neotropical – LINEO, Departamento de Biologia e Zootecnia, FEIS/UNESP – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Ilha Solteira, São Paulo/SP- Brazil, zipcode 15385-000.

† Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais, Instituto Chico Mendes da Conservação de Biodiversidade – CEPTA/ICMBio, Pirassununga/SP- Brazil, zipcode 13630-970.

‡ Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Instituto de Estudos em Saúde e Biológicas – IESB, Marabá/PA-Brazil, zipcode 68000-500.

§ Departamento de Biologia e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Ilha Solteira/SP- Brazil, zipcode 15385-000.

Abstract

The present study aimed to evaluate the vitellogenic transference and incorporation of long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) into the membranes of *Prochilodus lineatus* embryos, aiming to increase the permeability to cryoprotectants and resistance to electric fields. 130 broodstock of *Prochilodus lineatus* were kept in 2 excavated aquaculture tanks of 500m², feed with control (C) and fish oil supplemented diets (FO) during 12 months and induced to spawn by intracellular injections of pituitary gross extract. Total lipids of the embryos were extracted and the lipid extracts were separated into polar lipids and neutral fractions, and fatty acids (FAs) composition was determined. For the neutral fraction, the FO had a decrease in the MUFA group (C18:1 and C20:1), and increase in the n3PUFA and n6PUFA groups (EPA, DHA and AA), generating a LC-PUFA increase in the magnitude of 16%. The polar lipids fraction demonstrated similar pattern to that observed in neutral fractions. For FO a decrease of MUFA values (C18:1) while PUFA showed an increase, mainly in n6PUFA (C18:2n6 and C20:4n6). Finally, a significant increase of LC-PUFA was observed for embryos from fish oil-fed broodstock. To test for cryoprotectant toxicity embryos were placed in 24-well plates, where they were exposed for 20 minutes, the cryoprotectant solution of 1,2-Propanediol (Prop), concentration of 5 and 6 molar (M). For FO was observed in 5M a reduction in survival of 33.1% and no survival at 6M. Samples of embryos were exposed to six polarized electric fields (0, 3.4, 11.2, 16.9, 25.8, 40.2 and 51.6 joules), generated by the Sonopulse II apparatus of Ibramed. With 11.2J of energy, the C reducing survival in 98.3%, while the FO presented superior resistance, maintaining a survival similar to C up to 40.2J. Concludes that there was transfer of FA between broodstock and embryo of *P. lineatus*, with increase of LC-PUFA, resulting in the less survival rates in the cryoprotectants test for FO, and greater physical plasticity to FO embryos to electrical field tests. This alteration of the embryonic lipid profile helps in the cryopreservation studies allowing to reduce both the time of exposure to the cryoprotectants and the concentration of the solutions used, in addition to forming organisms resistant to new techniques, such as polarized electric field.

Keywords: biotechnology, cryoprotectants, fatty acids composition, *Prochilodus lineatus*, membrane fluidity.

Introduction

Cryopreservation is a biotechnological technique that allows biological material to be preserved at low temperatures. The cryopreservation methodologies still run into physiological problems related to the loss of functional and structural integrity of the membranes (ARAI; YAMAHA, 2015; DE LEEUW et al., 1990; HOLT; HEAD; NORTH, 1992; KHAN et al., 2012; YASUI et al., 2014; ZERON; SKLAN; ARAV, 2002), caused mainly by the nucleation and growth of ice crystals (HAGEDORN et al., 2004; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2007; ROBLES et al., 2009; STOTT; KARLSSON, 2009) and the high sensitivity of gametes and embryos to cold (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008; ESPINOZA et al., 2010; ZILLI; VILELLA, 2012). Attention to diet of female broodstock may be the key to improve membrane structure of gametes and embryos, since these female must accumulate sufficient energy-providing fatty acids (FA) and essential fatty acids from their diet to fuel growth and deliver the essential long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) that are required for successful larval production (BELL; SARGENT, 2003; BELL et al., 1989), these management can modify the properties of cell membranes, including membrane fluidity and membrane permeability of the egg and embryo, which can directly determine the success of cryopreservation methodologies (MIGAUD et al., 2013). Another promising methodology in increasing cellular permeability and efficiency in cryopreservation is electro-permeation. It was verified that the application of electric fields in the form of pulses and high intensity abruptly increase the conductance of biological membranes and the permeation of molecules, being able to reestablish the normal conditions of the membranes at the end of the treatment (GROSSE; SCHWAN, 1992; ZIMMERMANN et al., 1976).

Thus, the objective of this work was to evaluate the vitellogenic transference and incorporation of long-chain polyunsaturated fatty acids into the membranes of *Prochilodus lineatus* embryos, aiming to increase the permeability to cryoprotectants and resistance to electric fields.

Material and methods

The experiment described in this paper was conducted in accordance to by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), and were approved by the Ethics

Committee on Animal Use (CEUA), in the National Center for Research and Conservation of Continental Fishes (CEPTA/ICMBio) number 02031000008/2015-29.

Experimental procedures

One hundred and thirty specimens broodstock of *Prochilodus lineatus* provided by National Center for Research and Conservation of Continental Fishes (CEPTA/ICMBio) Pirassununga / S.P. (21°56'02.9"S 47°22'18.9"W). The animals used had a three years old, mean size of 24±8 cm weighing 380± 110g; and they were kept in 2 excavated aquaculture tanks of 500m², with the male to female ratio is 2 to 1. They animals were feed with control and oil supplemented diets during 12 months (02/2015 to 02/2016). Diets were manufactured in the National Center for Research and Conservation of Continental Fishes (CEPTA/ICMBio).

Two experimentais diets were used: Control (C) a conventional fish diet with fishmeal as the main protein source (Guabi-Pirá), and the supplemented diet (FO) in which was added, by spraying, 5% of marine fish oil (Campestre – 8016-14-6), diets fatty acids composition and bromatological analysis of the diets and fish oil are presented in table 7.1. The animals were manually fed twice a day at 3% of the fish biomass/day.

Reproducible breeding females were induced to spawn by intracellular injections of pituitary gross extract at dosages of 0.5 and 5.0 mg. Kg⁻¹ for females, and 1.0 mg.Kg⁻¹ for males. The embryos were maintained in 60 liter vertical incubators with continuous flow of water at a temperature of 29 ± 1.5°C and an oxygen rate of 5.2mg /L. The trials used embryos with 3 hours of development, in the Gastrulation stage (NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006).

Fatty acids analysis

Total lipids of the embryos were extracted with a mixture of chloroform, methanol, and water (2:1:0.5) according to Folch et al. (1957) adjusted by Parrish (1999) for aquatic organisms. After the evaporation of the solvents under N₂, the lipid extracts (as described above) were separated into polar lipids (phospholipids) and neutral lipids (triglycerides) using an activated silica column (YANG, 1995), and FAs composition was determined with

methyl esters using methylated with acetyl chloride and acidic methanol, method proposed by Christie and Han (2010).

Table 7.1 - Fatty acids composition (percentage of weight) of total lipid and bromatological analysis from broodstock diets.

	Control diet	Oil supplemented diet (FO)	Fish Oil
Fatty acids (%)			
C16:0	20.841	19.288	18.228
C16:1	2.086	5.024	8.041
C18:0	8.538	5.753	3.815
C18:1	33.09	21.837	14.571
C18:2n6	31.038	23.32	13.152
C18:3n3	0.681	2.902	1.963
C20:0	0.577	1.627	-
C21:0	0.48	1.075	-
C20:4n6	0.061	0.268	1.294
C20:5n3	0.303	8.163	17.964
C22:5n6	1.888	0.411	-
C22:5n3	0	0.931	1.957
C22:6n3	0.417	9.402	9.493
Moisture (%)	8.92	9.68	-
Crude Protein (%)	45.21	45.52	-
Fibre (%)	4.40	3.72	-
Ash (%)	11.43	11.26	-

Fonte: Elaboração do próprio autor.

The FA composition was determined as methyl esters, using a Varian Model 3900 Gas Chromatograph coupled to a flame ionization detector (FID) and a CP-8410 autoinjector). Hydrogen was used as a carrier gas at a linear velocity of 22cms⁻¹. The column was programmed at 170°C for 1 min, followed by a 2.5°Cmin⁻¹ ramp to 240°C and a final hold time of 5 min. The injector and FID temperatures were 250°C and 260°C, respectively. The FAs were identified by comparing their retention times to known standard retention times for fatty acid methyl esters (FAME) (Supelco, 37 components, Sigma Diagnostics INS; Larodan, Mixture Me93, and Qualimix PUFA fish M; and Menhaden Oil). The FAMES were analyzed in a capillary column (CP Wax 52 CB, 0.25-µm thickness, 0.25-mm inner diameter, and 30-m length).

Toxicity

The solutions of 1,2-Propanediol at concentrations of 5 and 6 Molar were used. The embryos were allocated into 24-well culture plates (6X4), a single embryo was placed per well. In each plate, the first row of wells was used as internal control of the plate, receiving only embryonic solution. While the other 20 wells received the cryoprotective solutions, for a period of 20 minutes. As external control, plates were used receiving only embryonic solution. After the treatments, the embryos were kept in incubators for 12 hours.

Electric field

Samples of 10 embryos, of each experimental group, were separated and packed in an electric field chamber (Figure 7.1), allowing to generate a polarized electric field between two aluminum electrodes in a 0.4 cm³ chamber filled with embryo solution (12mM NaCl + 1mM KCL + 1, 5 CaCl 2 + 1.5 mM MgCl 2).

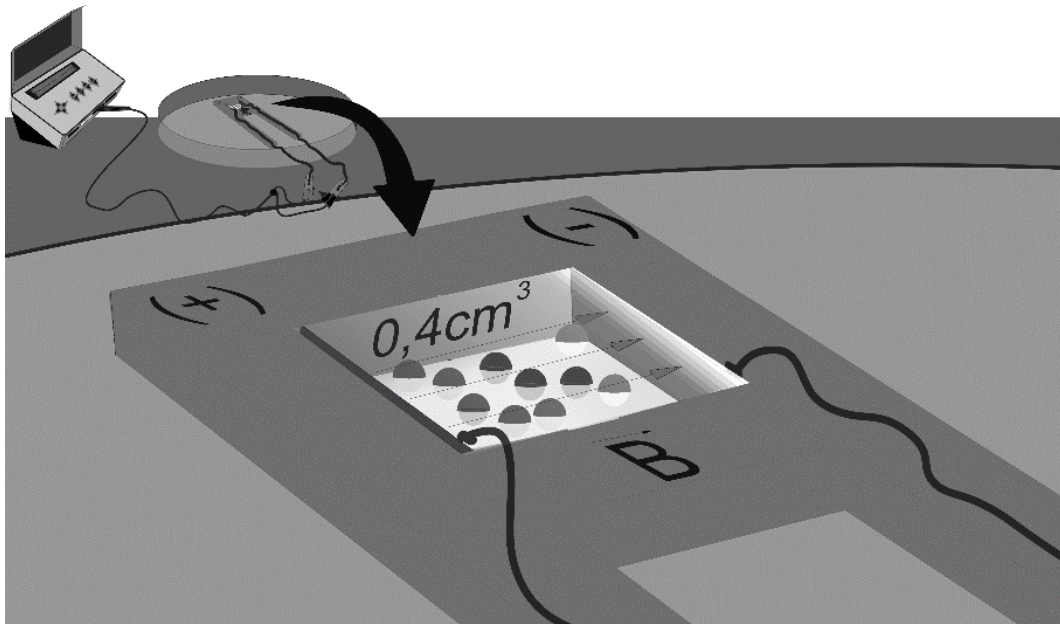
For the formation of the six polarized electric fields (Table 7.2), the Sonopulse II apparatus of Ibramed (ANVISA No. 10360310025) was used, electric current (mA), potential difference - ddp (Volts) and wattage measured using a Minipa multimeter (ET2042D) (Figure 7.2), also calculating the energy supplied [f (ε)] through equation 1. The sample groups were exposed to fields of 0, 3.4, 11.2, 16.9, 25.8, 40.2 and 51.6 joules. After the treatments, the embryos were kept in incubators for 12 hours.

Table 7.2 - Parameters of the polarized electric field. F (ε) - accumulated temporal energy (Joule), d.d.p. - potential difference (V), i – electric current (mA) and T - time (seconds).

Treatments	Time (s)	d.d.p. (V)	E. current (mA)	f(ε)
T1	15	39.2	5.9	3.4
T2	15	69	10.9	11.2
T3	15	62	18.2	16.9
T4	15	67	25.7	25.8
T5	15	73.6	36.5	40.2
T6	30	67	25.7	51.6

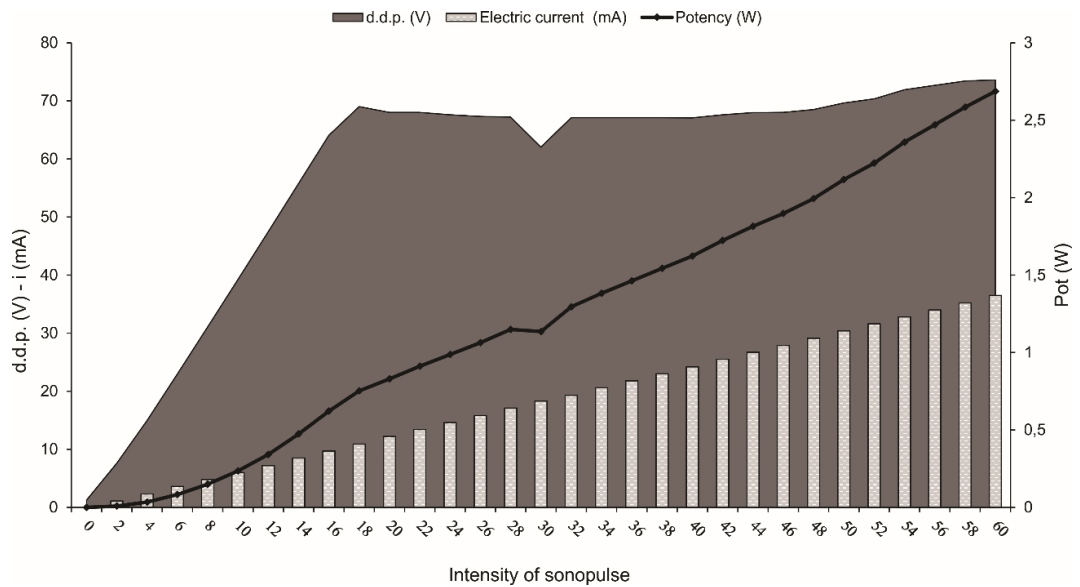
Fonte: Elaboração do próprio autor.

Figure 7.1 - Electric field chamber.



Fonte: Elaboração do próprio autor. (+) Positive pole; (-) Negative pole, Arrows- direction of polarized electric field.

Figure 7.2 - Electric field parameters.



Fonte: Elaboração do próprio autor. d.d.p. - potential difference (Voltz); i- electric current (mA); Potency (Watts)

Equation 1 - (Temporal energy) $f(\epsilon)$ - accumulated temporal energy (Joule), U – potential difference (V), i – electric current (mA), T – time (seconds) e D – duty (1 = continuous electric field).

$$f(\epsilon) = \frac{U \cdot i \cdot T \cdot D}{1000} \text{ (joule)}$$

Statistical analysis

Twelve hours after the treatments was quantified the relative survival of *P. lineatus* embryos. All treatments were performed randomly and evaluated using the software "R Development Core Team (2010)". The tests had five replicates containing 20 ± 1.3 embryos to fatty acids analysis, in the cryoprotective sensitivity and 10 ± 0.8 embryos in the evaluations of polarized electric field. For the comparisons, the Bartlett and Shapiro-Wilk tests were applied followed by Wilcoxon-Mann-Whitney and Kruskal Wallis tests.

Results

Fatty acids

The FA profile allowed to evaluate the percentage of each FA and consequently the main groups, saturated fatty acids (SFA), monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA), and the family of these FA such as, omega 3 (n3PUFA) and omega 6 (n6PUFA). In addition, calculations were performed to detect LC- PUFA of the different experimental groups.

For neutral fatty acids, mainly showing triglyceride composition, a statistically significant difference was not observed for total SFA, but a decrease from C16:0 to FO by approximately 10% was observed in comparison with the initial and C groups. On the other hand, C18:0, an important SFA, had its percentage increased in FO compared to the initial group (Table 7.3).

Also for the neutral fraction there was a decrease of MUFA in FO, with C18: 1 and C20: 1 as main responsible for this difference. This decrease had a direct impact on the PUFA increase in this experimental group, demonstrated principally by a significant increase of the two main groups, n3PUFA and n6PUFA. n3PUFA have significantly higher values for FO in the following fatty acids: C20:5n3 (EPA) and C22:6n3 (DHA). In addition, n6PUFA showed the same pattern as n3PUFA, with significantly higher values for FO in comparison with the initial group and C. The fatty acids responsible for these differences were: C18:2n6; C20:4n6 (AA) and C22:5n6. Finally, by analyzing LC-PUFA it was possible to observe significantly higher values for FO in the comparison in the initial group and C, the magnitude of increase was 16% in the comparison between FO and the initial group.

Table 7.3 - Fatty acid profile (%) of neutral lipids from embryos of *Prochilodus lineatus* from different broodstock diets (mean \pm SEM) Σ SFA; Σ MUFA; Σ PUFA; Σ n6, Σ n3 and LC-PUFA are the sum of saturated, monounsaturated, polyunsaturated, polyunsaturated n6, polyunsaturated n3 and long chain polyunsaturated fatty acids. ab Different letters indicate statistical differences among diets. Control diet – C; Oil supplemented diet - FO.

Fatty Acid (%)	Initial	C	FO
C15:0	2.4 \pm 0.56 ^{ab}	2.0 \pm 0.58 ^{ab}	3.6 \pm 1.64 ^{ab}
C16:0	37.3 \pm 1.54 ^a	32.1 \pm 1.69 ^{ab}	25.2 \pm 3.86 ^b
C16:1	11.0 \pm 0.22 ^{ab}	8.3 \pm 0.47 ^{ab}	8.2 \pm 1.43 ^{ab}
C18:0	4.6 \pm 0.33 ^a	6.0 \pm 0.54 ^{ab}	8.7 \pm 1.06 ^b
C18:1	31.6 \pm 3.16 ^a	28.8 \pm 2.01 ^a	16.1 \pm 1.79 ^b
C18:2n6	6.3 \pm 1.13 ^a	7.1 \pm 1.21 ^a	13.1 \pm 4.01 ^b
C18:3n3	0.5 \pm 0.36 ^{ab}	3.5 \pm 0.83 ^{ab}	4.0 \pm 2.22 ^{ab}
C20:1	2.4 \pm 0.31 ^{ab}	1.9 \pm 0.46 ^{ab}	0.9 \pm 0.14 ^{ab}
C20:2n6	1.4 \pm 0.03 ^{ab}	2.6 \pm 0.78 ^{ab}	2.5 \pm 1.28 ^{ab}
C20:4n6	0.8 \pm 0.31 ^a	0.8 \pm 0.24 ^a	8.0 \pm 4.50 ^b
C20:5n3	0.7 \pm 0.41 ^b	2.9 \pm 0.68 ^a	4.1 \pm 1.17 ^a
C22:2n6	0.4 \pm 0.28 ^{ab}	2.2 \pm 0.16 ^{ab}	1.7 \pm 0.85 ^{ab}
C22:5n6	0.2 \pm 0.05 ^a	0.3 \pm 0.03 ^{ab}	2.1 \pm 0.08 ^b
C22:6n3	0.5 \pm 0.13 ^a	1.4 \pm 0.35 ^{ab}	1.8 \pm 0.56 ^b
Σ SFA	44.3 \pm 1.76 ^{ab}	40.1 \pm 1.97 ^{ab}	37.5 \pm 5.26 ^{ab}
Σ MUFA	44.9 \pm 3.32 ^a	39.0 \pm 2.05 ^a	25.3 \pm 3.17 ^b
Σ PUFA	10.8 \pm 1.95 ^a	20.8 \pm 3.87 ^b	37.3 \pm 8.26 ^c
Σ PUFAn3	1.7 \pm 0.85 ^a	7.8 \pm 1.83 ^b	9.9 \pm 3.25 ^b
Σ FUFAn6	9.1 \pm 1.13 ^b	13.1 \pm 2.05 ^b	27.3 \pm 5.65 ^a
LC- PUFA	4.0 \pm 0.72 ^a	10.2 \pm 2.41 ^b	20.1 \pm 6.61 ^b

Fonte: Elaboração do próprio autor.

Analyzing the polar lipids fraction, the phospholipid pattern, it was possible to corroborate that verified for the neutral fraction, an absence of statistical difference in SFA. In MUFA, a decrease of values for FO was observed, mainly caused by the decrease of C18:1. PUFA showed a significant increase in FO percentages, notably a result of increased n6PUFA, with the fatty acids C18:2n6 and C20: 4n6 (AA) as responsible for these changes. Additionally, a significant increase of LC-PUFA was observed for embryos from fish oil-fed broodstock compared to the C group (Table 7.4).

Table 7.4 - Fatty acid profile (%) of polar lipids from embryos of *Prochilodus lineatus* from different broodstock diets (mean \pm SEM) Σ SFA; Σ MUFA; Σ PUFA; Σ n6, Σ n3 and LC-PUFA are the sum of saturated, monounsaturated, polyunsaturated, polyunsaturated n6, polyunsaturated n3 and long chain polyunsaturated fatty acids. ab Different letters indicate statistical differences among diets. Control diet – C; Oil supplemented diet - FO.

Fatty Acid (%)	Initial	C	FO
C15:0	0.6 \pm 0.10 ^{ab}	1.4 \pm 0.19 ^{ab}	1.2 \pm 0.30 ^{ab}
C16:0	18.9 \pm 1.57 ^{ab}	24.0 \pm 1.07 ^{ab}	20.5 \pm 1.70 ^{ab}
C16:1	2.5 \pm 0.22 ^{ab}	3.6 \pm 0.72 ^{ab}	3.5 \pm 0.50 ^{ab}
C18:0	19.5 \pm 2.02 ^{ab}	19.9 \pm 1.20 ^{ab}	15.7 \pm 2.13 ^{ab}
C18:1	17.6 \pm 1.91 ^a	17.6 \pm 0.76 ^a	11.5 \pm 1.08 ^b
C18:2n6	5.9 \pm 0.39 ^{ab}	5.5 \pm 0.74 ^a	7.1 \pm 0.84 ^b
C18:3n3	0.1 \pm 0.05 ^a	1.8 \pm 0.24 ^b	0.6 \pm 0.29 ^b
C20:1	1.2 \pm 0.41 ^{ab}	1.6 \pm 0.34 ^{ab}	1.0 \pm 0.16 ^{ab}
C20:2n6	2.8 \pm 0.25 ^a	1.7 \pm 0.37 ^{ab}	1.1 \pm 0.25 ^b
C20:4n6	14.1 \pm 0.95 ^{ab}	9.2 \pm 1.46 ^a	20.2 \pm 5.34 ^b
C20:5n3	2.7 \pm 0.60 ^a	3.1 \pm 0.23 ^a	3.2 \pm 0.44 ^a
C22:2n6	0.2 \pm 0.04 ^a	2.0 \pm 0.50 ^b	0.6 \pm 0.23 ^a
C22:5n6	6.2 \pm 0.74 ^{ab}	4.2 \pm 0.77 ^{ab}	7.1 \pm 1.61 ^{ab}
C22:6n3	7.6 \pm 2.85 ^a	4.3 \pm 1.62 ^a	6.5 \pm 1.44 ^a
Σ SFA	39.0 \pm 2.30 ^{ab}	45.3 \pm 1.31 ^{ab}	37.4 \pm 3.05 ^{ab}
Σ MUFA	21.4 \pm 2.27 ^{ab}	22.8 \pm 1.59 ^a	16.0 \pm 1.46 ^b
Σ PUFA	39.6 \pm 3.29 ^{ab}	31.9 \pm 1.96 ^a	46.6 \pm 4.19 ^b
Σ PUFAn3	10.4 \pm 2.53 ^a	9.2 \pm 1.65 ^a	10.4 \pm 1.63 ^a
Σ FUFAn6	29.2 \pm 0.77 ^a	22.7 \pm 1.62 ^b	36.2 \pm 5.54 ^a
LC- PUFA	33.6 \pm 3.50 ^a	24.6 \pm 2.20 ^b	38.8 \pm 4.76 ^a

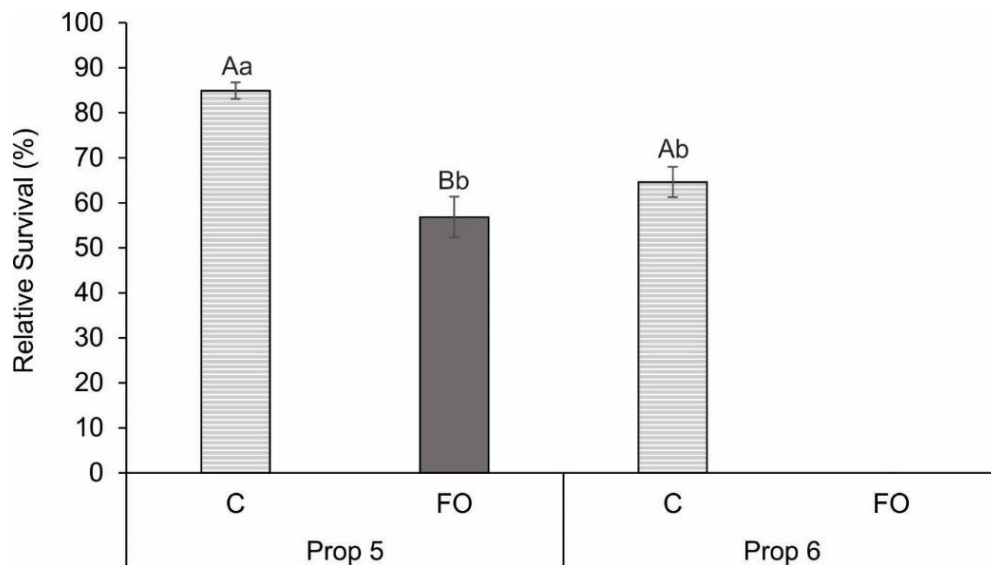
Fonte: Elaboração do próprio autor.

For the toxicity evaluations of the cryoprotectants, were used treatments with a coefficient of variation between the plates of less than 20% (Prop5-Control = 19.3%, Prop5-Oil = 10.6%, Prop6-Control = 15.9% and Prop6-Oil = 11.7%). When comparing treatments, the survival of the C group was higher than the FO in the two osmolarities (Prop5 - p = 0.001 and Prop6 - p = 0.0004), while in Prop5 there was a reduction in survival of 33.1%,

Prop6 did not present survival for FO (Figure 7.3). It is also possible to observe the statistical similarity between the survival of the Prop5-FO and Prop6-C treatment.

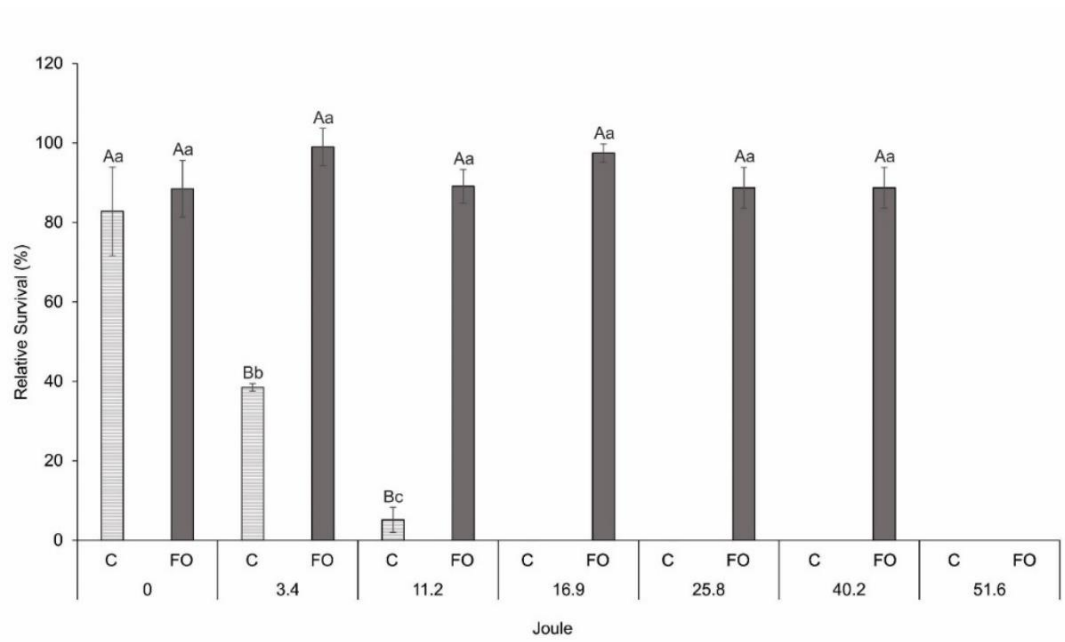
In the electric field evaluations it is observed that before receiving energy (0J) the percentage of survival was statistically similar in both groups. From 3.4J of energy supplied, this similarity changes, reducing 98.3% of embryo survival in C group to 11.2J. However, the FO group presented superior resistance to the treatment, maintaining a survival similar to the beginning of the experiment (0J) up to 40.2J accumulated (Figure 7.4).

Figure 7.3 – Survival of the embryos of *Prochilodus lineatus* after their exposure to two solutions of 1,2-Propanediol.



Fonte: Elaboração do próprio autor. Prop-5-5 Molar solution; Prop-6 - 6 Molar solution. A,B Upper case letters compare the groups statistically with the same concentration; a,b Lowercase letters statistically compare groups among different concentration. C – Control and FO - the supplemented fish diet with 5% of fish oil.

Figure 7.4 - Survival of the embryos of *Prochilodus lineatus* after their exposure to the polarized electric field.



Fonte: Elaboração do próprio autor. 0; 3,4; 11,2; 16,9; 25,8; 40,2 and 51,6 - accumulated joules. A, B Upper case letters statistically comparison among the groups with the same energy range; a, b lower case letters statistically comparison the groups among different energy ranges. C – Control and FO - the supplemented fish diet with 5% of fish oil.

Discussion

It is widely reported in the literature that the general state of reproducers significantly influence the reproductive success of fish species, and that maternal-fetal transfer of nutrients and other components occurs (DANTAGNAN et al., 2007; IZQUIERDO; FERNÁNDEZ-PALACIOS; TACON, 2001; IZQUIERDO; FERNANDEZ-PALACIOS; JAYA-RAM et al., 2008; MIGAUD et al., 2013; SARGENT; TOCHER; BELL, 2002; SARGENT, 1995; THE et al., 2009). In this work we hypothesized the possibility of altering the membrane structure in embryos of *P. lineatus* through the vitellogenic transference of LC-PUFA, and possible modifications and improvement of cryogenic parameters.

Broodstock nutrition shows a direct relationship with reproductive success in marine and freshwater fish (ALMANSA et al., 2001; MIGAUD et al., 2013), given that the nutrients used by females during vitellogenesis might impact both the quality and the

chemical features of eggs and consequently the progeny development (WIEGAND et al., 1991; FERNÁNDEZ-PALACIOS et al., 1995; TYLER AND SUMPTER, 1996; IZQUIERDO et al., 2001). In this work it was possible to observe a direct correlation between the formulated diet and the neutral and polar lipid composition of the embryos, with increase mainly of LC-PUFA, and consequent decrease of MUFA for the two lipid classes analyzed. Among the LC-PUFAs it is possible to highlight a considerable increase of C20:5n3 (EPA) and C20:4n6 (AA) in the neutral lipid fraction and C20:4n6 (AA) in the polar lipids for FO in comparison with group C, which may be associated with the membrane fluidity and correct physiological functions for bound membrane enzymes and cell functions (MANDAWALA et al., 2016; MIGAUD et al., 2013).

The composition of fatty acid content in the diet or it may be related to a specific requirement in fish related to physiological adaptations to the environments (FAO, 2014; HOCHACHKA; SOMERO, 2002). The low permeability of the biological membranes may hinder the diffusion of the cryoprotectants (ADAMS; ZHANG; RAWSON, 2005; HAGEDORN et al., 1997, 1998), making the cryopreservation protocols using high concentrations of cryoprotectant solutions (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008) in long periods of exposure, to balance the extra and intracellular medium (ROUTRAY et al., 2002; SUZUKI et al., 1995). The effect of these chemicals inside cells, when in low concentrations, helps control ice nucleation and also prevents damage to proteins and DNA (ACKER; MCGANN, 2003). However, as its concentration rises, its performance becomes deleterious, causing damage to the cytoskeleton, denaturing proteins and fragmenting the genetic material (ZILLI; VILELLA, 2012). Thus, reducing the concentration of the cryoprotectants and the time of exposure of the biological material would aid in controlling their unwanted side effects.

Another methodology to increase the permeabilization of biological membranes is electroporation. When the embryos are exposed to a polarized electric field, their free ions form internal magnetic poles (DIMOVA et al., 2007; DIMOVA et al., 2009) and promote an increase in the potential difference in the cell membrane, promoting increased permeability (WEAVER; CHIZMADZHEV, 1996; VAN UITERT et al., 2010). The amount of energy supplied is essential to the success of the technique and in this work prove that FO form embryos with a highly superior resistance to the polarized electric field, allowing a great range of work to reach higher indices of diffusion of the cryoprotective chemicals or elements of greater molecular weight. This large range of work is essential

since under low energy only alter its morphological conformation of the cell or embryo, or to break definitively in case the field exceeds the levels of stability of the membrane (DIMITROV et al., 1990). However, when supplied at optimal levels, the membrane begins to form transient and reversible pores in order to balance the ddp that forms through the biological membrane, allowing to increase the rate of diffusion of molecules of high molecular weight (DIMITROV; SOWERS, 1990; LEE et al., 1993).

After analysis of the results it was possible to conclude that there was transfer of FA between broodstock and embryo of *P. lineatus*, with increase of LC-PUFA for both lipid fractions analyzed, this transference allowed differential results in the survival and toxicity rates in the two experimental groups, with increased toxicity to the FO group, demonstrating a possible input of cryoprotectants into the intracellular medium. Thus, these embryos would allow the use of solutions with lower osmolality, such as Prop 5M which allows similar indices to the control embryos exposed to a concentration of 6M; or, allowed reaching the chemical balance in a shorter period, reducing the side effects of cryoprotectants. In addition, the change in FA composition allowed greater physical plasticity to FO embryos to electrical field tests, which may be related to an increase in membrane fluidity in this experimental group. This technique is influenced by the composition of the membrane that directly alters its resistance and consequently the pore formation capacity (VAN UITERT; LE GAC; VAN DEN BERG, 2010).

Thus, FO diet by modifying the lipid profile of embryonic membranes, results in embryos with membranes that are more stable and more resistant to electric fields. It is believed that their membranes become much more malleable, resulting in characteristics such as greater permeability and higher resistance, being excellent models in the researches of cryopreservation, electropermabilization, iontophoresis and transgenesis.

Acknowledgments

This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) [grants number 2013/02588-5 (PhD scholarship); 2015/10115-5 (Regular project)]; the National Center for Research and Conservation of Fish Continental - CEPTA / ICMBIO, which provided fish and plants used in this study, Guabi the supply of feed. We are thankful to the Laboratory of Metabolism and Fish Reproduction (LAMEROA) at the University of São Paulo for lab (fatty acids analysis) assistance during this study.

References

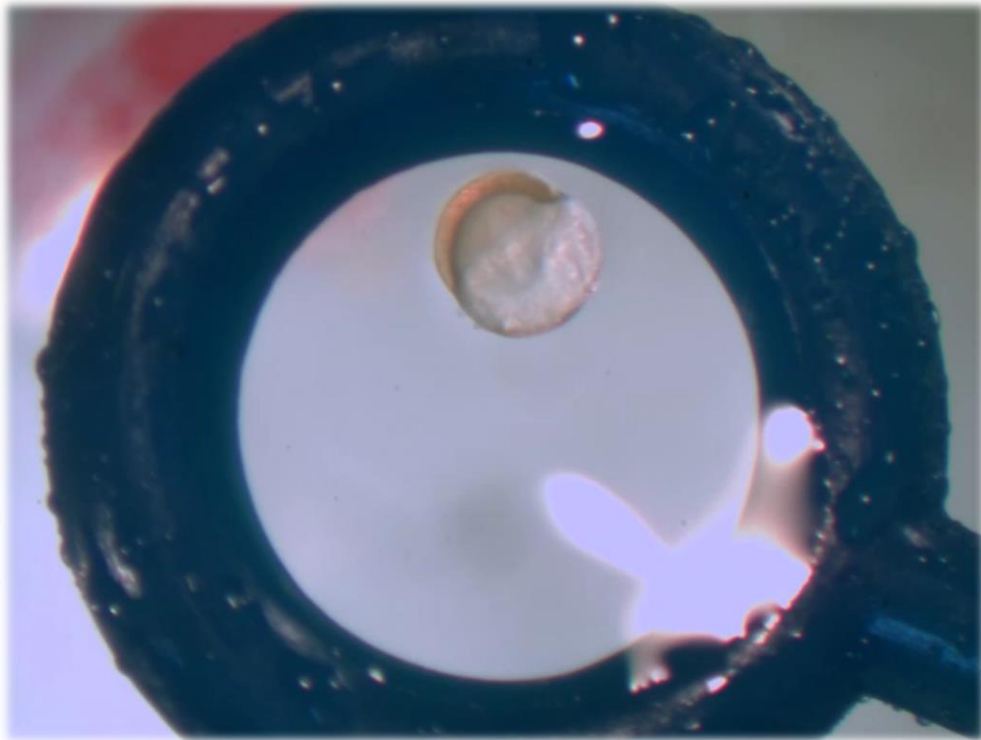
- ACKER, J. P.; MCGANN, L. E. Protective effect of intracellular ice during freezing? **Cryobiology**, v. 46, n. 2, p. 197–202, 2003.
- ADAMS, S. L.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. The effect of external medium composition on membrane water permeability of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, v. 64, n. 7, p. 1591–1602, 15 out. 2005.
- ALMANSA, E. et al. Lipid and fatty acid composition of female gilthead seabream during their reproductive cycle: effects of a diet lacking n-3 HUFA. **Journal of Fish Biology**, v. 59, p. 267–286, 2001.
- ARAI, K.; YAMAHA, E. Technical note : Viability and motility of vitrified / thawed primordial germ cell isolated from common carp (*Cyprinus carpio*) somite embryos 1. p. 495–500, 2015.
- BELL, J. G. et al. The effect of enhanced intake of linoleic acid on the fatty acid composition of tissue polar lipids of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Lipids**, v. 24, n. 3, p. 240–242, 1989.
- BELL, J. G.; SARGENT, J. R. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. **Aquaculture**, v. 218, p. 491–499, 2003.
- DANTAGNAN, H. et al. Lipid and fatty acid composition during embryo and larval development of puye Galaxias maculatus Jenyns, 1842, obtained from estuarine, freshwater and cultured populations. **Journal of Fish Biology**, v. 70, n. 3, p. 770–781, 2007.
- DE LEEUW, F. E. et al. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, v. 27, n. 2, p. 171–83, abr. 1990.
- DIMITROV, D. S.; SOWERS, A. E. Membrane electroporation--fast molecular exchange by electroosmosis. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1022, n. 3, p. 381–92, 1990.
- DIMOVA, R. et al. Giant vesicles in electric fields. **Soft Matter**, v. 3, n. 7, p. 817, 2007.
- DIMOVA, R. et al. Vesicles in electric fields: Some novel aspects of membrane behavior †. **The Royal Society of Chemistry**, p. 3201–3212, 2009.
- ESPINOZA, C.; VALDIVIA, M.; DUPRÉ, E. Morphological alterations in cryopreserved spermatozoa of scallop *Argopecten purpuratus* Alteraciones morfológicas en espermatozoides criopreservados de concha de abanico *Argopecten purpuratus*. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 38, n. 1, p. 121–128, 2010.
- FAO. **FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics- 2012.**
- FERNÁNDEZ-PALACIOS, H. et al. Effect of n-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). **Aquaculture**, v. 132, p. 325–337, 1995.
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of biological chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497–509, maio 1957.
- GROSSE, C.; SCHWAN, H. P. Cellular membrane potentials induced by alternating fields. **Biophysical Journal**, v. 63, n. 6, p. 1632–1642, dez. 1992.
- HAGEDORN, M. et al. Water distribution and permeability of zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. **The Journal of experimental zoology**, v. 278, n. 6, p. 356–71, 1997.

- HAGEDORN, M. et al. Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo. **Biology of reproduction**, v. 59, n. 5, p. 1240–50, nov. 1998.
- HAGEDORN, M. et al. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option. **Cryobiology**, v. 49, n. 2, p. 181–9, out. 2004.
- HOCHACHKA, P.; SOMERO, G. **Biochemical Adaptation : Mechanism and Process in Physiological Evolution**. New York: Oxford University Press, 2002.
- HOLT, W. V.; HEAD, M. F.; NORTH, R. D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. **Biology of reproduction**, v. 46, n. 6, p. 1086–94, jun. 1992.
- IZQUIERDO, M. ; FERNÁNDEZ-PALACIOS, H.; TACON, A. G. . Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. **Aquaculture**, v. 197, n. 1-4, p. 25–42, jun. 2001.
- IZQUIERDO, M.; FERNANDEZ-PALACIOS, H. Nutritional requirements of marine fish larvae and broodstock. **CIHEAM - Options Méditerranéennes**, p. 243–264, 2008.
- JAYA-RAM, A. et al. Influence of dietary HUFA levels on reproductive performance, tissue fatty acid profile and desaturase and elongase mRNAs expression in female zebrafish *Danio rerio*. **Aquaculture**, v. 277, n. 3-4, p. 275–281, jun. 2008.
- KHAN, A. et al. Mesendoderm specification depends on the function of Pou2 , the class V POU-type transcription factor , during zebrafish embryogenesis. 2012.
- MANDAWALA, A. A. et al. Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. **Theriogenology**, v. 86, n. 7, p. 1637–1644, 2016.
- MIGAUD, H. et al. Gamete quality and broodstock management in temperate fish. **Reviews in Aquaculture**, v. 5, n. SUPPL.1, 2013.
- NINHAUS-SILVEIRA, A. et al. Structural and ultrastructural characteristics of the yolk syncytial layer in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Teleostei; Prochilodontidae). **Zygote (Cambridge, England)**, v. 15, n. 3, p. 267–71, ago. 2007.
- NINHAUS-SILVEIRA, A. et al. Cryogenic preservation of embryos of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote (Cambridge, England)**, v. 17, n. 1, p. 45–55, 2008.
- NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; DE AZEVEDO, A. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote (Cambridge, England)**, v. 14, n. 3, p. 217–29, ago. 2006.
- PARRISH, C. C. Determination of total lipid, lipid classes and fatty acids in aquatic samples. In: WAINMAN, M. T. A. AND B. C. (Ed.). . **Lipids in Freshwater Ecosystems**. New York: Springer-Verlag, 1999. p. 4–12.
- ROBLES, V. et al. Embryo cryopreservation: What we know until now. In: ELSA CABRITA, VANESA ROBLES, P. H. (Ed.). . **Methods in reproductive aquaculture: Marine and Freshwater Species**. New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2009. p. 265–294.
- ROUTRAY, P. et al. Factors affecting the uptake of DMSO by the eggs and embryos of medaka , *Oryzias latipes*. **Theriogenology**, v. 58, p. 1483–1496, 2002.
- SARGENT, J. R. Origins and functions of egg lipids: Nutritional implications. In: BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. (Eds.). . **Broodstock management and egg and larval quality**. Cambridge: Blackwell Science Ltd. University Press, 1995. p. 353–372.

- SARGENT, J. R.; TOCHER, D. R.; BELL, J. G. The Lipids. In: HALVER, J.; HARDY, R. (Eds.). . **Fish Nutrition, Third Edition**. Washington, D.C.: Academic Press, 2002. p. 824.
- STOTT, S. L.; KARLSSON, J. O. M. Visualization of intracellular ice formation using high-speed video cryomicroscopy. **Cryobiology**, v. 58, n. 1, p. 84–95, 2009.
- SUZUKI, T. et al. Relation between Fish Embryos Toxicity of Cryoprotectant DMSO and Its Concentration in several Fish embryos. **Fisheries Science**, v. 61, n. 2, p. 193–197, 1995.
- THE, F. O. R. et al. Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.) Broodstock Nutrition: The Role Of Arachidonic Acid And Astaxanthin As Determinants Of Egg Quality. n. July, 2009.
- TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Oocyte growth and development in teleosts. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 6, n. 3, p. 287–318, set. 1996.
- VAN UITERT, I.; LE GAC, S.; VAN DEN BERG, A. The influence of different membrane components on the electrical stability of bilayer lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1798, n. 1, p. 21–31, 2010.
- WEAVER, J. C.; CHIZMADZHEV, Y. A. Theory of electroporation: A review. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 41, n. 2, p. 135–160, dez. 1996.
- WIEGAND, M. D.; KITCHEN, C. L.; HATALEY, J. M. Incorporation of yolk fatty acids into body lipids of goldfish (*Carassius auratus* L.) larvae at two different temperatures. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 9, n. 3, p. 199–213, 1991.
- YANG, Z. **Development of gas chromatographic method for profiling neutral lipids in marine samples**. St. John's: Memorial University of Newfoundland, 1995.
- YASUI, G. S. et al. Production of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) germ-line chimera using transplantation of primordial germ cells isolated from cryopreserved blastomeres 1. p. 2380–2388, 2014.
- ZERON, Y.; SKLAN, D.; ARAV, A. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 2, p. 271–278, 2002.
- ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Studies on Chilling Sensitivity of Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Embryos. **Cryobiology**, v. 32, p. 239–246, 1995.
- ZILLI, L.; VILELLA, S. Effect of Cryopreservation on Bio-Chemical Parameters , DNA Integrity , Protein Profile and Phosphorylation State of Proteins of Seawater Fish Spermatozoa. In: KATKOV, I. I. (Ed.). . **Current Frontiers in Cryobiology**. [s.l.] InTech, 2012. p. 592.
- ZIMMERMANN, U. et al. Effects of External Electrical Fields on Cell Membranes. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 83, p. 58–83, 1976.

CAPÍTULO 8

Vitrificação e aquecimento de embriões, com perfil lipídico manipulado, expostos ao campo elétrico polarizado (+) e a solução de 1,2-Propanediol 5 M.



Raphael da Silva Costa

Vitrificação e aquecimento de embriões, com perfil lipídico manipulado, expostos ao campo elétrico polarizado (+) e a solução de 1,2-Propanediol 5 M.

Raphael da Silva Costa ^{a,c}, Fabrício Marçal Silva de Souza ^a, José Augusto Senhorini ^b, Cristiane Bashiy-Silva^a, Rosicleire Verissimo Silveira ^a, Diógenes Henrique de Siqueira Silva^c, Cristiele da Silva Ribeiro^d, Alexandre Ninhaus-Silveira ^{a*}.

^a Departamento de Biologia e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Avenue Brasil, 56, Ilha Solteira - São Paulo, Brazil. zipcode 15385-000

^b Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais at Instituto Chico Mendes da Conservação de Biodiversidade – CEPTA/ICMBio, Pirassununga, São Paulo, Brazil

^c Pós-Graduação em Biologia Animal, IBILCE/UNESP/Campus de São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

^d Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Instituto de Estudos em Saúde e Biológicas – IESB, Marabá/PA-Brazil, zipcode 68000-500.

* Corresponding author. Tel: +551837431285; Fax: +551837422140

E-mail address: ninhaus@bio.feis.unesp.br

Resumo

Este trabalho objetivou vitrificar e aquecer embriões, com perfil lipídico manipulado, de *Prochilodus lineatus* expostos ao campo elétrico polarizado (+) e imersos em solução de 1,2-Propanediol (Prop) a 5 molar. Utilizou-se embriões no estágio de Gastrulação, enriquecidos com ácidos graxos Poliinsaturado (PUFA n-3 e n-6), em três tratamentos de vitrificação. No tratamento controle (Ct), os embriões foram submetidos a uma sequência de 3 banhos, em soluções crioprotetoras de Prop com osmolaridade crescente [12mM NaCl + 1mM KCl + 1.5 CaCl₂ + 1.5mM MgCl₂ + Prop (1.25 - 2.5 - 5M)]. Nos tratamentos elétricos (Et1) e (Et2), o último passo de imersão foi realizada em uma câmara (0.4 cm³) preenchida com solução Prop 5M, sendo submetidos aos campos elétricos polarizados (+) Et1 [campo contínuo/0.9 Joule] e Et2 [campo descontínuo/1.7Joule] gerados pelo Sonopulse II/Ibramed. Posteriormente, os embriões foram alocados em uma lâmina de Prop-5M (10µl), mergulhados no nitrogênio líquido e depositados em um botijão criogênico (MVE, XC20) por 2 meses. Durante o aquecimento, optou-se por submergir o material vitrificado em água a 30°C, ou expô-los à temperatura da sala 27°C±1.2°C. Todas as amostras apresentaram um aspecto vítreo, sendo observado a nucleação dos cristais de gelo apenas durante o aquecimento. Em Ct o último núcleo de gelo a se desfazer ocorreu na região do saco vitelino, fenômeno não observado em ET1 e ET2. Morfologicamente, Ct e Et2 possuíam anomalias severas, como extensas fissuras na blastoderme, rupturas da vesícula vitelina com escape de vitelo e separação de tecidos adjacentes; sendo em Et2 comprovado também alterações do vitelo na região periférica da vesícula, formando embriões com formato de “caracol”. Em Et1 os embriões se mantiveram morfologicamente estruturados pós descongelamento, apresentando pequenas e não numerosas fissuras na região do blastoderme. Nenhum dos tratamentos permitiu a continuidade do desenvolvimento embrionário. Conclui-se que, embriões enriquecidos com PUFA n-3 e n-6 submetidos ao campo elétrico de 0.9 Joule são mais plásticos, o que aumenta tanto a sua resistência ao estresse mecânico do processo, quanto a sua permeabilidade aos crioprotetores, características que reduzem os efeitos deletérios da nucleação dos cristais e aumentam a integridade embrionária. Esse estudo auxilia na área da criopreservação apresentando embriões mais resistentes aos protocolos de vitrificação e aquecimento.

Palavras-chave: Embriões, gástrula, biotecnologia, plasticidade, permeabilidade.

Introdução

A criopreservação é uma técnica que teve seu primeiro sucesso descrito em 1949 preservando espermatozoides em solução de glicerol (POLGE; SMITH; PARKES, 1949). Com peixes, essa metodologia iniciou seus estudos em 1953 buscando criopreservar espermatozoides e oócitos de *Clupea harengus*, também utilizando o glicerol (BLAXTER, 1953). Até os dias de hoje, esta biotecnologia é estabelecida apenas para espermatozoides (VIVEIROS; GODINHO, 2009; YASUI et al., 2009) e blastômeros (LIN et al., 2009; MARINA et al., 2002; STRUSSMANN et al., 1999; YASUI et al., 2011), mantendo-se inviável ainda para oócitos e embriões de peixes devido sua complexidade morfofisiológica.

Embriões de peixes são complexos sistemas biológicos estruturados por diferentes compartimentos com específicas osmolaridade, que ao se associar uma anatomia esferoide, proporciona uma baixa relação entre a área de superfície e o seu volume, resultando em um organismo com baixa permeabilidade e grandes barreiras metabólicas, que dificultam ainda mais essa metodologia (JARAMILLO et al., 2012; ROBLES et al., 2009).

Devido as grandes dificuldades encontradas, as metodologias de criopreservação ainda promovem a perda da integridade funcional e estrutural das membranas (DE LEEUW et al., 1990; HOLT; HEAD; NORTH, 1992; KIRICHEK et al., 2016). Isso pois, sua baixa permeabilidade dificulta a difusão das soluções crioprotetoras, que impediriam a nucleação e crescimento dos cristais de gelo, e promove a retenção da água intraembrionária, formando regiões de nucleação e grandes cristais de gelo entre 0 e - 50°C (CABRITA et al., 2003; NEVES et al., 2012; ZILLI et al., 2003).

Assim, devido à baixa permeabilidade das membranas e a necessidade de elevadas concentrações interna dos químicos protetores, uma das saídas normalmente utilizadas é aumentar o tempo de exposição e/ou a concentração das soluções. No entanto, o seu uso pode levar a efeitos adversos quando não se equilibra variáveis como concentração, tempo de exposição, classes dos químicos crioprotetores que compõem a solução (FAHY, 2010), fase embrionária (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008), temperatura de exposição e taxa de difusão das membranas (SUZUKI et al., 1995; ZHANG; RAWSON, 1995, 1996; ZHANG et al., 2003).

Assim, o objetivo deste trabalho foi vitrificar e aquecer embriões de *Prochilodus lineatus* enriquecidos com ácidos graxos poliinsaturado (PUFA n-3 e n-6), expostos ao campo elétrico polarizado (+) e imersos em solução de 1,2-Propanediol.

Material e métodos.

O experimento descrito neste trabalho foi conduzido de acordo com o Instituto Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA), no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais (CEPTA / ICMBio) número 02031000008 / 2015-29.

Procedimentos experimentais

A descrição do manejo dos reprodutores, a composição bromatológica da ração comercial e a alteração da composição lipídica embrionária, tornando-se rico em PUFA n-3 e n-6 estão descritos no capítulo 7.

Vitrificação

Embriões com características normais de desenvolvimento, foram selecionados e submetidos a três protocolos para a vitrificação: No primeiro protocolo, tratamento controle (Ct), os embriões foram submetidos apenas a uma sequência de 3 banhos, por imersão, em soluções crioprotetoras com osmolaridade crescente [12mM NaCl + 1mM KCl + 1.5 CaCl₂ + 1.5mM MgCl₂ + Prop (1.25 - 2.5 - 5M)]. O segundo e terceiro tratamento, associaram o uso dos crioprotetores ao campo elétrico (Et1 e Et2), gerados pelo Sonopulse II da Ibramed (ANVISA No. 10360310025). Após os dois primeiros passos de imersão, os embriões foram acondicionados em uma câmara ("electric field chamber") com volume igual a 0,4cm³, preenchida com solução embrionária crioprotetora (Prop 5M); sendo submetidos ao campo elétrico polarizado (+) nos segundos finais do terceiro banho. Em Et1 os embriões foram expostos a um campo contínuo de 0,9 J (19 Volts e 3.1 miliamper) por 15 segundos, já em Et2, foram expostos a 1,7J (39.2 volts, 5.9 miliamper, campo descontínuo – 50%) por 15 segundos.

Por fim, vinte embriões por tratamento, foram vitrificados em nitrogênio líquido, utilizando o dispositivo "embryo's cryotube", permitindo acondicionar os embriões em uma lâmina de solução com volume igual a 10µl, sendo posteriormente depositados em botijão criogênico (MVE, XC20) e mantidos por um período de 2 meses.

A escolha do crioprotetor e a seleção dos parâmetros de campo elétrico polarizado, foram definidos em estudos prévios.

Desvitrificação

Os procedimentos para a desvitrificação das amostras ocorreram conforme a descrição do capítulo 3.

Estereomicroscopia

Os procedimentos para coloração e análise ocorreram conforme a descrição do capítulo 2.

Histologia.

Os procedimentos para fixação, microtomia e coloração ocorreram conforme a descrição do capítulo 2.

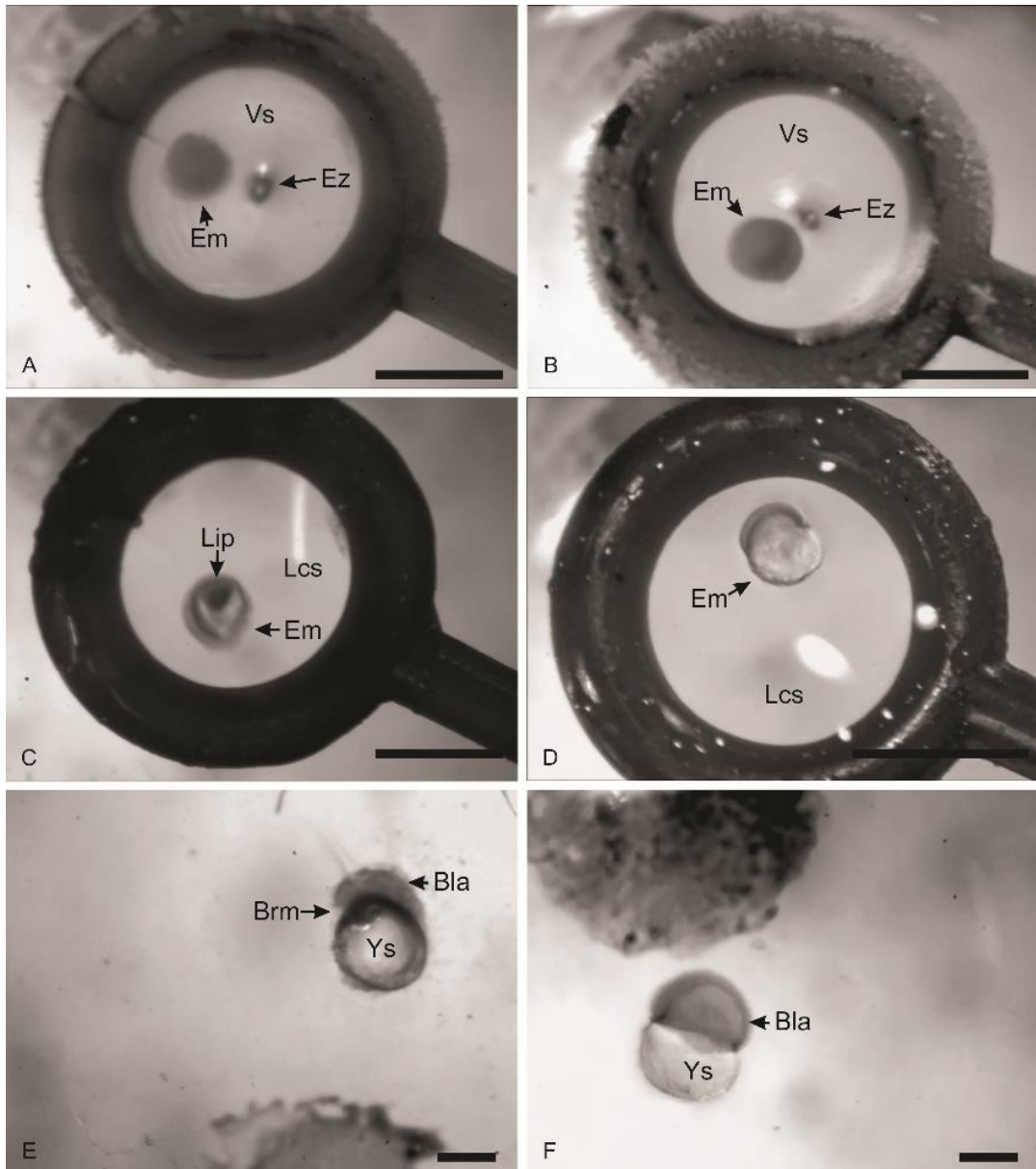
Resultados

Os protocolos de vitrificação permitiram a formação de um sólido vítreo com uma zona de dilatação central e sem a presença de regiões brancas, indicativas da nucleação dos cristais de gelo (Figuras 8.1 A e B).

No entanto, a nucleação e crescimento dos cristais de gelo fez-se presente durante o processo de aquecimento. Em todos os tratamentos a última região a descongelar foi o entorno embrionário; contudo, em Ct o vitelo apresentou um tempo de descongelamento superior, sendo possível observar claramente o último foco de gelo desaparecendo nesta região (Figura 8.1 C), resultando no final em embriões totalmente deformado (Figura 8.1 E). Nos tratamentos Et1 e Et2 o descongelamento embrionário ocorreu de forma uniforme, não sendo observado este foco final de gelo no vitelo (Figura 8.1 D), permitindo no final de Et1 a manutenção de embriões com menos avarias externas (Figura 8.1 F). Nenhum embrião resistiu aos tratamentos propostos. Ao comparar a morfologia do embrião “in natura” (Figura 8.2 A) com os vitrificados, observa-se que, com intensidades diferentes,

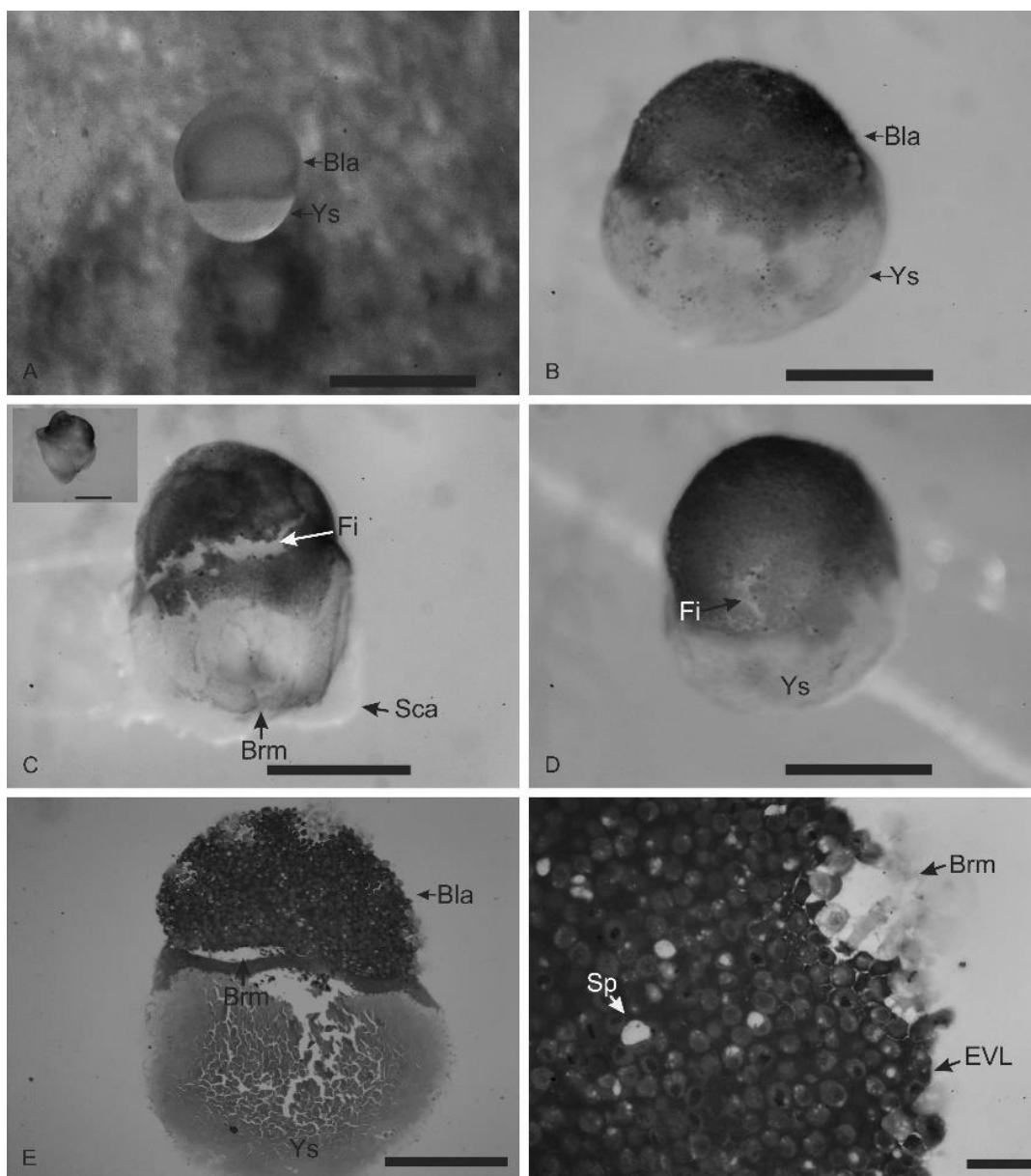
todos sofrem alterações morfológicas. Et1 foi o protocolo que apresentou uma morfologia mais próxima ao normal, (Figura 8.2 B), sendo observado pequenas fissuras na região da blastoderme (Figura 8.2 D), enquanto em Et2, observou-se rupturas severas na blastoderme e vesícula vitelina (Figura 8.2 C), sendo encontrado também modificações na região periférica do vitelo, formando embriões com formato de caracol (Figura 8.2 C-inset). Por fim, em Ct encontrou-se o deslocamento de tecidos (Figura 8.2 E) e rompimentos tecidual (Figura 8.2 F).

Figura 8.1 - Vitrificação e aquecimento embrionário de *Prochilodus lineatus*.



Fonte: Elaboração do próprio autor. Solução Crioprotetora - NaCl 12 mM + KCL + 1 mM 1,5 CaCl₂ + 1,5 mM MgCl₂ + Prop (1,25 - 2,5-5M). A, C e E - Controle (0 Joule). B, D e F - Tratamento elétrico (Et1 - 0,9 J, 19 Volts, 3,1 miliamper e 30 segundos). Sólido Vítreo - Vs; Zona de expansão -Ez; Embrião - Em; último ponto de gelo - Lip; Solução crioprotetora líquida - Cls; Rompimento da membrana - Brm; Blastoderme - Bela; Saco vitelínico - Ys. Escalas: A - D - 1,5mm; E - F 100µm.

Figura 8.2 - Injúria após vitrificação e aquecimento.



Fonte: Elaboração do próprio autor. A – Fase de gástrula “in nature”. B e D - Tratamento elétrico 1 (Et1 - 0,9 J, 19 Volts, 3,1 miliamper e campo contínuo). C - Tratamento elétrico 2 (Et2 - 1,75 J, 39,2 Volts, 5,9 miliamper e campo descontinúo 50%); Inset - embrião em forma de caracol. E-F - Tratamento de controle (Ct - 0 J). Blastoderme - Bla; Saco Vitelínico - Ys; Fissura - Fi; Rompimento da membrana - Brm; Escape do vitelo - Sca; Espaço - Sp; Camada envelope - EVL. Escala: A - E - 100 μ m; F - 20 μ m.

Discussão

A solução crioprotetora Prop-5M permitiu a formação de um sólido amorfo, que diminui a expansão das moléculas de água, evitando o rompimento tecidual. Acredita-se, que o processo de vitrificação seja o mais promissor dentro da criopreservação, pois seu processo de solidificação ocorre não pela formação de cristais de gelo, mas pelo aumento da viscosidade da solução, fazendo com que o meio sólido mantenha as mesmas características do meio líquido (ALI; SHELTON, 1993; CHEN; TIAN, 2005; EL-DANASOURI; SELMAN, 2005). Assim, ao vitrificar-se uma solução, pode-se evitar danos promovidos pela nucleação dos cristais de gelo e pelo choque osmótico promovido pelo aumento da osmolaridade da fração líquida, durante o resfriamento (FAHY; SAUR; WILLIAMS, 1990; FORNARI et al., 2011; NEVES et al., 2012).

Apesar do sucesso ao evitar a formação de cristais de gelo durante a vitrificação, os protocolos de aquecimento não foram eficientes, iniciando a cristalização sempre na direção da periferia da amostra ao centro. O grau máximo do congelamento ocorre em segundos, sendo observado neste momento, regiões com diferentes densidades de gelo, sendo visualmente definida por regiões brancas alternadas com regiões translúcidas. O processo de recristalização é um fenômeno altamente deletério as metodologias de criopreservação, não somente por romper membranas, tecidos biológicos ou desnaturar proteínas (MAZUR, 1984; RUBINSKY; PEGG, 1988; SEKI; MAZUR, 2012), mas também porque dificulta a avaliação de qualquer metodologia pós vitrificação, fazendo com que todas as metodologias aplicadas demonstrem danos semelhantes, necessitando de estudos mais focados ao período de aquecimento.

Assim, ao não se controlar a recristalização das amostras, permite-se injúrias como espaços entre as células da blastoderme, fissuras e perda de contato entre membranas adjacentes, todas encontradas neste trabalho. Uma das iniciativas deste trabalho foi utilizar embriões com elevados níveis de PUFA n-3 e n-6. A composição dos ácidos graxos altera a capacidade de difusão das membranas, podendo, em baixas concentrações, dificultar os tratamentos criogênicos (ADAMS; ZHANG; RAWSON, 2005; HAGEDORN et al., 1997, 1998), ou em elevadas concentrações, auxiliá-los (MIYATA et al., 2012; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008) evitando longos períodos de exposição, para equilibrar os meios extra e intracelulares (ROUTRAY et al., 2002; SUZUKI et al., 1995).

O efeito desses produtos químicos dentro das células, quando em baixas concentrações, ajuda a controlar a nucleação do gelo e também evita danos às proteínas e ao DNA (ACKER; MCGANN, 2003). No entanto, à medida que sua concentração aumenta, seu desempenho se torna deletério, causando danos ao citoesqueleto, desnaturando proteínas e fragmentando o material genético (ZILLI; VILELLA, 2012; ZILLI et al., 2003). Deste modo, ao reduzir a concentração dos crioprotetores e o tempo de exposição pode-se controlar esses efeitos secundários indesejados.

Outra metodologia para aumentar a permeabilização das membranas biológicas é a electroporação, que neste trabalho permitiu vitrificar e aquecer embriões de *P. lineatus* com poucas injúrias, quando comparados aos outros protocolos. Quando os embriões são expostos a um campo elétrico polarizado, seus íons livres formam polos magnéticos internos (DIMOVA et al., 2007, 2009) e promovem um aumento na diferença de potencial na membrana celular, promovendo um aumento da permeabilidade (VAN UITERT; LE GAC; VAN DEN BERG, 2010; WEAVER; CHIZMADZHEV, 1996). A quantidade de energia fornecida é essencial para o sucesso dessa técnica, uma vez que, sob baixa energia altera-se a apenas sua morfologia esférica, retornando ao seu estado natural após o fim do campo. (DIMITROV; APOSTOLOVA; SOWERS, 1990a; DIMITROV, 1995; NEUMANN; KAKORIN, 1996; NEUMANN et al., 1982). No entanto, quando os níveis fornecidos são adequados, as membranas formam poros transitórios e reversíveis para equilibrar o ddp que se forma através da membrana biológica, permitindo aumentar a taxa de difusão de moléculas de elevado peso molecular (DIMITROV; APOSTOLOVA; SOWERS, 1990a; DIMITROV; SOWERS, 1990b). Fato que possivelmente justifica o descongelamento uniforme dos embriões expostos ao campo elétrico, uma vez que devido a maior concentração interna de crioprotetores mais rápido seria a troca de calor e consequente desaparecimento dos cristais de gelo. Ainda aqui, uma concentração interna elevada de crioprotetores seria um indicativo da causa da redução nos danos morfológicos, uma vez que esse excedente em crioprotetor reduziria as nucleações e o aumento do volume dos cristais de gelo.

Conclui-se que, embriões enriquecidos com PUFA n-3 e n-6 submetidos ao campo elétrico de 0.9 Joule são mais plásticos, o que aumenta tanto a sua resistência ao estresse mecânico do processo, quanto a sua permeabilidade aos crioprotetores, características que reduzem os efeitos deletérios da nucleação dos cristais e aumentam a integridade embrionária pós vitrificação.

Agradecimentos

Este trabalho contou com o apoio da Fundação de Pesquisa de São Paulo (FAPESP) [bolsa de doutorado número 2013 / 02588-5]; O Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continental - CEPTA / ICMBIO, que forneceu os peixes e local para desenvolvimento dos experimentos, Guabi o fornecimento de ração. Agradecemos ao Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Peixes (LAMEROA), da Universidade de São Paulo, para a realização de análises laboratoriais (análise de ácidos graxos).

Bibliografia

- ACKER, J. P.; MCGANN, L. E. Protective effect of intracellular ice during freezing? **Cryobiology**, v. 46, n. 2, p. 197–202, 2003.
- ADAMS, S. L.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. The effect of external medium composition on membrane water permeability of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, v. 64, n. 7, p. 1591–602, 15 out. 2005.
- ALI, J.; SHELTON, J. N. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. **Journal of reproduction and fertility**, v. 99, n. 2, p. 471–7, nov. 1993.
- BLAXTER, J. H. S. Sperm Storage and Cross-Fertilization of Spring and Autumn Spawning Herring. **Nature**, v. 172, p. 1189–1190, 1953.
- CABRITA, E. et al. Dimethyl sulfoxide influx in turbot embryos exposed to a vitrification protocol. **Theriogenology**, v. 60, p. 463–473, 2003.
- CHEN, S. L.; TIAN, Y. S. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. **Theriogenology**, v. 63, p. 1207–1219, 2005.
- DE LEEUW, F. E. et al. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, v. 27, n. 2, p. 171–83, abr. 1990.
- DIMITROV, D. S. Electroporation and Electrofusion of Membranes. In: **Handbook of Biological Physics**. [s.l.] Elsevier Science B.V, 1995. v. 1p. 851–900.
- DIMITROV, D. S.; APOSTOLOVA, M. A.; SOWERS, A. E. Attraction, deformation and contact of membranes induced by low frequency electric fields. **BBA - Biomembranes**, v. 1023, n. 3, p. 389–397, 1990a.
- DIMITROV, D. S.; SOWERS, A. E. Membrane electroporation--fast molecular exchange by electroosmosis. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1022, n. 3, p. 381–92, 1990b.
- DIMOVA, R. et al. Giant vesicles in electric fields. **Soft Matter**, v. 3, n. 7, p. 817, 2007.
- DIMOVA, R. et al. Vesicles in electric fields : Some novel aspects of membrane behavior †. **The Royal Society of Chemistry**, p. 3201–3212, 2009.
- EL-DANASOURI, I.; SELMAN, H. Vitrification versus conventional cryopreservation technique. **Middle East Fertility Society Journal**, v. 10, n. 3, p. 205–206, 2005.

- FAHY, G. M. Cryobiology Cryoprotectant toxicity neutralization q , qq. **Cryobiology**, v. 60, p. 45–53, 2010.
- FAHY, G. M.; SAUR, J.; WILLIAMS, R. J. Physical problems with the vitrification of large biological systems. **Cryobiology**, v. 27, n. 5, p. 492–510, 1990.
- FORNARI, D. C. et al. Freezing injuries in the embryos of *Piaractus mesopotamicus*. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 19, n. 4, p. 345–50, nov. 2011.
- HAGEDORN, M. et al. Water distribution and permeability of zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. **The Journal of experimental zoology**, v. 278, n. 6, p. 356–71, 1997.
- HAGEDORN, M. et al. Characterization of a Major Permeability Barrier in the Zebrafish Embryo. **Biology of reproduction**, v. 59, p. 1240–1250, 1998.
- HOLT, W. V.; HEAD, M. F.; NORTH, R. D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. **Biology of reproduction**, v. 46, n. 6, p. 1086–94, jun. 1992.
- JARAMILLO, R. et al. Caracterización electroforética de las proteínas del corion normal Electrophoretic characterization for both normal and hard chorion proteins of *Salmo salar*. **medicina veterinaria**, v. 65, p. 59–65, 2012.
- KIRICHEK, O. et al. Segregated water observed in a putative fish embryo cryopreservative Subject Category : Subject Areas : **Royal Society**, p. 1–9, 2016.
- LIN, C. et al. Effect of chilling and cryopreservation on expression of Pax genes in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and blastomeres. **Cryobiology**, v. 59, n. 1, p. 42–7, ago. 2009.
- MARINA, P. et al. Fine structure of leydig and sertoli cells in the testis of immature and mature spotted ray *Torpedo marmorata*. **Molecular reproduction and development**, v. 63, n. 2, p. 192–201, out. 2002.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **The American journal of physiology**, v. 247, n. 3 Pt 1, p. C125–42, set. 1984.
- MIYATA, K. et al. Supercooling and vitrification of aqueous glycerol solutions at normal and high pressures. **Cryobiology**, v. 65, n. 2, p. 113–6, out. 2012.
- NEUMANN, E. et al. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. **The EMBO Journal**, v. 1, n. 7, p. 841–845, 1982.
- NEUMANN, E.; KAKORIN, S. Electrooptics of membrane electroporation and vesicle shape deformation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 1, n. 6, p. 790–799, dez. 1996.
- NEVES, P. R. et al. Injuries in pacu embryos (*Piaractus mesopotamicus*) after freezing and thawing. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 22, n. 1, p. 25–31, fev. 2012.
- NINHAUS-SILVEIRA, A. et al. Cryogenic preservation of embryos of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote (Cambridge, England)**, v. 17, n. 1, p. 45–55, 2008.
- NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; DE AZEVEDO, A. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote (Cambridge, England)**, v. 14, n. 3, p. 217–29, ago. 2006.
- POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, p. 666, 1949.

- ROBLES, V. et al. Embryo cryopreservation: What we know until now. In: ELSA CABRITA, VANESA ROBLES, P. H. (Ed.). **Methods in reproductive aquaculture: Marine and Freshwater Species**. New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2009. p. 265–294.
- ROUTRAY, P. et al. Factors affecting the uptake of DMSO by the eggs and embryos of medaka, *Oryzias latipes*. **Theriogenology**, v. 58, p. 1483–1496, 2002.
- RUBINSKY, B.; PEGG, D. E. A mathematical model for the freezing process in biological tissue. **Proceedings of the Royal Society of London.**, v. 234, n. 1276, p. 343–58, 23 ago. 1988.
- SEKI, S.; MAZUR, P. Ultra-rapid warming yields high survival of mouse oocytes cooled to -196°C in dilutions of a standard vitrification solution. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e36058, jan. 2012.
- STRUSSMANN, C. et al. Cryopreservation of isolated fish blastomeres: effects of cell stage, cryoprotectant concentration, and cooling rate on postthawing survival. **Cryobiology**, v. 39, n. 3, p. 252–61, nov. 1999.
- SUZUKI, T. et al. Relation between Fish Embryos Toxicity of Cryoprotectant DMSO and Its Concentration in several Fish embryos. **Fisheries Science**, v. 61, n. 2, p. 193–197, 1995.
- VAN UITERT, I.; LE GAC, S.; VAN DEN BERG, A. The influence of different membrane components on the electrical stability of bilayer lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1798, n. 1, p. 21–31, 2010.
- VIVEIROS, A T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish physiology and biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 137–50, mar. 2009.
- VLAHOVSKA, P. M. et al. Electrohydrodynamic model of vesicle deformation in alternating electric fields. **Biophysical journal**, v. 96, n. 12, p. 4789–803, 17 jun. 2009.
- WEAVER, J. C.; CHIZMADZHEV, Y. A. Theory of electroporation: A review. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 41, n. 2, p. 135–160, dez. 1996.
- YASUI, G. S. et al. A sperm cryopreservation protocol for the loach *Misgurnus anguillicaudatus* and its applicability for other related species. **Animal reproduction science**, v. 116, p. 335–345, 2009.
- YASUI, G. S. et al. Production of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) germ-line chimera using transplantation of primordial germ cells isolated from cryopreserved blastomeres. **Journal of animal science**, v. 89, n. 8, p. 2380–8, ago. 2011.
- ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Studies on Chilling Sensitivity of Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Embryos. **Cryobiology**, v. 32, p. 239–246, 1995.
- ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Feasibility Studies on Vitrification of Intact Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Embryos. **Cryobiology**, v. 33, n. 1, p. 1–13, fev. 1996.
- ZHANG, Y. Z. et al. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. **Theriogenology**, v. 60, n. 5, p. 989–996, set. 2003.
- ZILLI, L. et al. Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. **Cryobiology**, v. 47, n. 3, p. 227–235, dez. 2003.
- ZILLI, L.; VILELLA, S. Effect of cryopreservation on bio-chemical parameters, DNA integrity, protein profile and phosphorylation state of proteins of seawater fish spermatozoa. In: **Current Frontiers in Cryobiology**. [s.l.] Intechopen, 2012. p. 392–414.

CONCLUSÕES GERAIS.

Conclui-se que:

- O crioprotetor 1,2-Propanediol a 5 ou 6M, possui baixa toxidez aos embriões de *Prochilodus lineatus* e permite a formação de um sólido vítreo.
- As anomalias relacionadas neste trabalho, possivelmente são frutos da alta osmolaridade das soluções e não apenas pela natureza do químico utilizado.
- Os testes de vitrificação aqui realizados esbarraram na recristalização durante o aquecimento, gerando laceração teciduais e rompimento da vesícula vitelina.
- Os tratamentos de ultrassom não alteram a sobrevivência embrionária quando se utiliza pulsos de 16Hz com uma densidade energética total até 1.12W/cm², mantendo a energia transmitida por pulso inferior a $3.9 \cdot 10^{-4}$ W/cm².
- Os embriões de *Prochilodus lineatus* são altamente sensíveis aos campos elétricos polarizados aqui avaliados.
- É possível modificar a composição lipídica embrionária, gerando embriões mais plásticos, tornando-se mais sensíveis aos crioprotetores e mais resistentes a campos elétricos.
- A vitrificação de embriões ricos em PUFA n-3 e n-6, aumentam a resistência embrionária ao processo, descongelando embriões com menos anormalidades.
- Necessita-se de mais estudos em todos os tópicos abordados neste trabalho; contudo, com uma ênfase maior ao processo de aquecimento das amostras vitrificadas, buscando controlar o fenômeno da recristalização.