

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP – CAUNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**RESFRIAMENTO DE EMBRIÕES DE PACU, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887) EM
DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO ONTOGENÉTICO**

Aluna: Taís da Silva Lopes

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Elizabeth Romagosa

Co-orientador: Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Jr

Jaboticabal

São Paulo – Brasil

Fevereiro de 2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP – CAUNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**RESFRIAMENTO DE EMBRIÕES DE PACU, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887) EM
DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO ONTOGENÉTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura, do Centro de Aquicultura da UNESP, Campus da Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Aquicultura, área de concentração em Aquicultura em Águas Continentais

Aluna: Taís da Silva Lopes

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Elizabeth Romagosa

Co-orientador: Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Jr

Jaboticabal

São Paulo – Brasil

Fevereiro de 2010

Lopes, Taís da Silva
F864r Resfriamento de embriões de pacu, *Piaractus mesopotamicus*
(HOLMBERG, 1887) em diferentes fases do desenvolvimento ontogenético /
Taís da Silva Lopes. -- Jaboticabal, 2010
ix, 65 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2010
Orientador: Elizabeth Romagosa
Banca examinadora: Luis David Solis Murgas, Sérgio Ricardo Batlouni
Bibliografia

1. Pacu-criopreservação. 2. Peixes-embriões. 3. Embriões-resfriamento. I.
Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.31

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
– Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Ao amor,

sentimento esse tão grandioso que move nossas vidas, e nos leva em busca de nossos objetivos.

A meus pais,

José Claro e Dorotí, que tanto amo, e que estiveram ao meu lado em cada momento de felicidade ou dificuldade.

Dedico

"Para viver de verdade, pensando e repensando a existência, para que ela valha à pena, é preciso ser amado, e amar, e amar-se. Ter esperança, qualquer esperança. Questionar o que nos é imposto, sem rebeldias insensatas, mas sem demasiada sensatez. Saborear o bom, mas aqui e ali enfrentar o ruim. Suportar sem se submeter. Aceitar sem se humilhar. Entregar-se sem renunciar a si mesmo e à possível dignidade. Sonhar, porque se desistimos disso apaga-se a última claridade e nada mais valerá a pena. Escapar, na liberdade do pensamento, desse espírito de manada que trabalha obstinadamente para nos enquadrar, seja lá no que for. E que o mínimo que a gente faça seja, a cada momento, o melhor que afinal se conseguiu fazer."

Lya Luft

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Ao Centro de Aqüicultura da UNESP.

Aos meus orientadores Elizabeth Romagosa e Danilo Pedro Streit Jr.

Aos membros do grupo de pesquisa PEIXEGEN/UEM pela ajuda, companheirismo e amizade durante a realização do trabalho e, em especial ao coordenador Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro, pelo apoio.

Aos membros do grupo de pesquisa *Aquam*/UFRGS pelo auxílio na parte prática e estatística.

Aos professores do Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP, Dr. Euclides Braga Malheiros e Dr. José Carlos Barbosa, pela atenção dispensada nas discussões sobre estatística dos dados.

À Estação de Aqüicultura e Hidrologia da Duke Energy Brasil, Salto Grande, São Paulo.

À Estação de piscicultura CODAPAR-UEM, e aos funcionários Victor, Cleiton e José Geraldo.

Ao Laboratório de Histologia e Embriologia Animal da FCAV/UNESP, em especial a Prof^a Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi, que gentilmente cedeu equipamentos para a realização de parte do projeto.

Aos membros da comissão examinadora, de qualificação e defesa, que aceitaram o convite (Dr^a. Laura Satiko Okada Nkaghi, Dr. Robie Bombardelli, Dr. Luis David Solis Murgas e Dr. Sérgio Ricardo Batlouni).

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Aos meus pais e familiares pelo incentivo.

Aos amigos que presentes ou não estiveram torcendo pela conclusão de mais essa etapa de minha vida.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

TAÍS DA SILVA LOPES - Nascida em 13 de novembro de 1984, em Maringá-PR, é Zootecnista formada pela Universidade Estadual de Maringá-UEM, em dezembro de 2007. Foi bolsista do Programa de Educação Tutorial-PET, de janeiro de 2004 a maio de 2007, na mesma instituição, além de estagiar no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Piscicultura. Ingressou, em março de 2008, no Programa de Pós-graduação, Mestrado em Aqüicultura, Área de Concentração em Aqüicultura em Águas Continentais, do Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO GERAL	1
II. OBJETIVO GERAL.....	3
III. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 ESPÉCIE ESCOLHIDA	4
3.2 CARACTERÍSTICAS E FASES DE DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES	6
3.3 CRIOPRESERVAÇÃO E CRIOPROTETORES UTILIZADOS EM EMBRIÕES DE PEIXES	9
3.4 SENSIBILIDADE DOS EMBRIÕES DE PEIXE AO FRIO.....	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
IV. RESFRIAMENTO DE EMBRIÕES DE PACU, <i>Piaractus mesopotamicus</i> (HOLMBERG, 1887) EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DURANTE SEIS E DEZ HORAS DE ESTOCAGEM.....	20
4.1 INTRODUÇÃO.....	21
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.3 RESULTADOS.....	27
4.4 DISCUSSÃO	31
AGRADECIMENTOS.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
V. CURVAS DE RESFRIAMENTO PARA EMBRIÕES DE PACU, <i>Piaractus mesopotamicus</i> (HOLMBERG, 1887) ESTOCADOS A -8°C.....	38
5.1 INTRODUÇÃO.....	39
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	40
5.3 RESULTADOS.....	42
5.4 DISCUSSÃO	45
AGRADECIMENTOS.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
VI. ANEXOS.....	48

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. Representação dos principais compartimentos do embrião (vitelo, camada sincicial do vitelo e blastoderme) e estruturas extra-embrionárias (espaço perivitelinico e córion) de peixes teleósteos.....	8
RESFRIAMENTO DE EMBRIÕES DE PACU, <i>Piaractus mesopotamicus</i> (HOLMBERG, 1887) EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DURANTE SEIS E DEZ HORAS DE ESTOCAGEM	
FIGURA 1. Fluxograma do resfriamento de embriões <i>P. mesopotamicus</i> nos quatro estádios embrionários em dois tempos de estocagem.....	26
FIGURA 2. Embriões de <i>P. mesopotamicus</i> . I: Fechamento do blastóporo (8-hpf): 1- diâmetro do embrião, 2- diâmetro do córion. II: Aparecimento da vesícula óptica (13,3-hpf): 1- diâmetro maior do embrião, 2- diâmetro menor do embrião e, 3- diâmetro do córion.....	27
FIGURA 3. Porcentual de larvas totais (LT) e subdivisão em larvas (vivas, LV; mortas, LM; não-eclodidas, LNE; ovos gorados, OG) para embriões de <i>P. mesopotamicus</i> , nos estádios embrionários de 14-, 5,2-, 8- e 13,3-hpf submetidos ao resfriamento por dois períodos..	29
FIGURA 4. Medidas de diâmetro do córion dos estádios embrionários de <i>P. mesopotamicus</i> utilizados no resfriamento, no momento da coleta dos embriões (controle), após seis e 10 horas de refrigeração.....	30
FIGURA 5. Medidas de diâmetro do embrião dos estádios embrionários de <i>P. mesopotamicus</i> utilizados no resfriamento, no momento da coleta dos embriões (controle), após seis e 10 horas de refrigeração.....	31

CURVAS DE RESFRIAMENTO PARA EMBRIÕES DE PACU, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887) ESTOCADOS A -8°C .

- FIGURA 1. A: Ovos gorados que foram descartados e, B: Ovos selecionados viáveis (embriões no estágio de fechamento do blastóporo) (estereomicroscópio, 40X)..... 41
- FIGURA 2. Fluxograma de resfriamento de embriões de *P. mesopotamicus* sendo os embriões em solução crioprotetora (G1) submetidos a diferentes curvas de resfriamento e a solução crioprotetora (G2) passando pelas diferentes curvas, recebendo os embriões após queda da temperatura..... 42
- FIGURA 3. Efeito das curvas de resfriamento no grupo G1 em relação ao total de larvas (LT); larvas natantes (LN); larvas mortas (LM); larvas não eclodidas (LNE) e; ovos gorados (OG) de *P. mesopotamicus* estocados a -8°C por seis horas..... 44
- FIGURA 4. Efeito das curvas de resfriamento no grupo G2 em relação ao total de larvas (LT); larvas natantes (LN); larvas mortas (LM); larvas não eclodidas (LNE) e; ovos gorados (OG) de *P. mesopotamicus* estocados a -8°C por seis horas..... 44
- FIGURA 5. Porcentual de larvas totais entre as curvas de resfriamento para ambos os grupos (G1-embriões em solução crioprotetora e G2-solução crioprotetora) observados em embriões de *P. mesopotamicus* estocados por seis horas, a -8°C 45

LISTA DE TABELAS

	Pág.
RESFRIAMENTO DE EMBRIÕES DE PACU, <i>Piaractus mesopotamicus</i> (HOLMBERG, 1887) EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DURANTE SEIS E DEZ HORAS DE ESTOCAGEM.	
TABELA 1. Porcentual de larvas (vivas, LV; mortas, LM; não-eclodidas, LNE; ovos gorados, OG) para os embriões de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , nos estádios embrionários de 1,4-, 5,2-, 8- e 13,3-hpf utilizados como controle.....	27
TABELA 2. Larvas totais (LT) e subdivisão em larvas (vivas, LV; mortas, LM; não-eclodidas, LNE; ovos gorados, OG) de embriões de <i>P. mesopotamicus</i> submetidos à solução crioprotetora com metanol e sacarose, estocados a -8 ⁰ C por seis e 10 horas.....	28
TEBELA 3. Larvas vivas (LV) de embriões de <i>P. mesopotamicus</i> nos diferentes estádios embrionários submetidos à solução crioprotetora com metanol e sacarose, estocados a -8 ⁰ C por seis e 10 horas.....	28
CURVAS DE RESFRIAMENTO PARA EMBRIÕES DE PACU, <i>Piaractus mesopotamicus</i> (HOLMBERG, 1887) ESTOCADOS A -8 ⁰ C.	
TABELA 1. Porcentagem de larvas totais (LT): natantes (LN), mortas (LM) e, não eclodidas (LNE); e ovos gorados (OG) para os dois grupos: G1-embriões em solução crioprotetora e G2-solução crioprotetora e posterior recebimento dos embriões de <i>P. mesopotamicus</i> que foram estocados a -8 ⁰ C por seis horas.....	43
TABELA 2. Porcentagem de LN (larvas natantes) de embriões de <i>P. mesopotamicus</i> que foram estocados a -8 ⁰ C por seis horas, em diferentes formas de submissão a solução crioprotetora (G1-embriões em solução crioprotetora e G2-solução crioprotetora e posterior recebimento dos embriões).....	43
TABELA 3. Comparação entre as curvas de resfriamento na porcentagem de larvas: natantes (LN), mortas (LM) e, não eclodidas (LNE); e	

ovos gorados (OG) de <i>P. mesopotamicus</i> estocados a -8°C por seis horas.....	45
--	----

I. INTRODUÇÃO GERAL

Face ao drástico declínio dos estoques naturais de peixes no mundo e às estimativas de que a pesca extrativista levará, nas próximas décadas, ao esgotamento irreversível dos principais estoques de peixes de interesse comercial, tornando-se imprescindível o desenvolvimento de métodos de conservação dos gametas e sua aplicação na reprodução (Serralheiro, 2008). Ainda, alia-se ainda à questão do desenvolvimento de tecnologias para o controle da produção trazendo elementos perfeitamente compatíveis com o que se preconiza para uma atividade aquícola ecologicamente sustentável e socialmente responsável, bem como, a sustentabilidade dos recursos e a segurança dos processos de criação.

A criopreservação de gametas também pode ser utilizada como ferramenta para a manutenção da variabilidade genética, fundamental em qualquer programa de melhoramento genético (Falconer, 1987). Ainda, diante de construções de barragens nos rios, para geração de energia elétrica, faz-se necessário programas de conservação de gametas para evitar os impactos negativos na ictiofauna (Sirol e Britto, 2006).

A capacidade técnica para conservação de gametas de peixes e de invertebrados aquáticos tem se expandido rapidamente nos últimos anos, impulsionada principalmente pela indústria aquícola (Carolsfeld et al., 2003). Nos últimos 25 anos, atenção especial tem sido direcionada a criopreservação de ovos e embriões de peixes, mas até o momento os resultados são contraditórios e desencorajadores (Zhang et al., 2007), com isso tem-se utilizado o resfriamento como alternativa, além de oferecer informações que colaborem com a criopreservação.

Nessas técnicas são necessários que ovos e embriões sejam resistentes ao choque térmico, que por sua vez dependem do vitelo disponível que é determinante na fase de ontogenia em que se encontram, bem como, ao efeito da toxicidade dos crioprotetores, portanto, os três itens acima citados estão relacionados entre si. Ou seja, essas três prerrogativas encontram-se diretamente relacionadas para o sucesso de técnicas de conservação.

É imprescindível para o resfriamento de embriões de peixes que os mesmos sejam resistentes ao frio suportando redução de temperaturas. Entretanto, esta diminuição de temperatura pode provocar injúrias nas células ou tecidos, que encontram-se classificadas em duas categorias: (a) rápido resfriamento ou choque térmico (direto) e, (b) resfriamento

lento que é usualmente manifestado após longos períodos de exposição a baixas temperaturas (indireto) (Morris e Watson, 1984).

Os primeiros protocolos de resfriamento de embriões de peixes migradores foram descritos por Ahammad et al. (1998) para *Labeo rohita*, *Catla catla* e *Cirrhinus mrigalha* e por Ahammad et al., (2002) para *Cyprinus carpio*. Para as espécies de peixes nativas sul-americanas, Streit et al. (2007) utilizaram como espécie modelo o *Piaractus mesopotamicus*.

Inúmeros benefícios vêm sendo apontados a partir do domínio da técnica de resfriamento como, por exemplo, permitir a coleta de embriões em lugares remotos, mantê-los em refrigerador durante o transporte até um local em que possam ser incubados com maior segurança (Hagedorn e Kleinhans, 2000).

Além da resistência aos choques térmicos, deve-se conhecer qual a fase do desenvolvimento ontogenético que os ovos ou embriões permanecem íntegros, bem como a toxicidade aos crioprotetores, que é outro aspecto de fundamental importância para o domínio da técnica (Gwo et al., 1995; Zhang e Rawson, 1995; Hagedorn et al., 1997).

Para Zhang e Rawson (1995), trabalhando com *Danio rerio*, a sensibilidade ao frio é mais elevada nos estádios iniciais de desenvolvimento embrionário devido à elevada quantidade de lipídios no embrião, dificultando a ação de proteção dos crioprotetores. Os autores afirmaram que os lipídios representam quantidades superiores a 52% do peso seco dos ovos, sendo geralmente, as fases mais desenvolvidas de embriões de peixes suportam melhor a toxicidade dos crioprotetores (Bart, 2000). Porém, o organismo encontrando-se em uma fase mais complexa, outras dificuldades surgem na utilização da técnica de preservação.

A aplicação de novas biotecnologias voltadas para o aperfeiçoamento do manejo reprodutivo, permitirá o incremento da produção aquícola além de diminuir a pressão sobre os estoques pesqueiros e várzeas, e diminuir os custos com a importação de pescado (Ostrensky et al., 2008), bem como a utilização do melhoramento genético. Diante do exposto, pode-se verificar que ainda são necessários mais estudos para que a técnica de criopreservação possa ser utilizada na conservação de embriões de peixes, entretanto, para conservação em períodos determinados, o resfriamento tem sido uma alternativa a ser aprimorada.

II. OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de tempo de estocagem em diferentes estádios de desenvolvimento embrionário, e curvas de resfriamento, sobre a viabilidade de embriões de pacu, *P. mesopotamicus* conservados a -8°C.

III. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Espécie escolhida

O *Piaractus mesopotamicus*, popularmente denominado como pacu, caranha, pacu-caranha ou pacu-guaçu, pertence à ordem dos Characiformes, família Characidae e subfamília Myleinae (Nakatani et al., 2001). É originário da bacia dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai (Godoy, 1975). É a terceira espécie nativa mais cultivada no Brasil (IBAMA, 2007) por apresentar excelentes características zootécnicas como rusticidade, crescimento rápido, fecundidade elevada e grande aceitação no mercado (Castagnolli e Zuim, 1985; Castagnolli, 1992).

O pacu possui hábito alimentar onívoro, porém, na natureza sua alimentação sofre flutuações que dependem além da disponibilidade de alimento, das variações ambientais e da migração reprodutiva (Gonçalves e Urbinati, 2005).

Nesta espécie o desenvolvimento gonadal é do tipo sincrônico em grupo, e a desova é total ou única ocorrendo na primavera-verão (Romagosa, 1991), principalmente em novembro podendo variar até fevereiro, época em que são verificadas as temperaturas mais elevadas e é maior a incidência de chuvas (Romagosa et al., 1988).

O início da maturação gonadal de fêmeas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* ocorre no terceiro ano de idade, com cerca de 34 cm de comprimento sendo que, com cinco anos, em média 42 cm de comprimento, as fêmeas adultas encontram-se aptas à reprodução (Bernardino e Lima, 1999).

Entre os peixes reofílicos, a maturação gonadal do pacu, *P. mesopotamicus*, é controlada por fatores externos ambientais (temperatura, horas de luz e pluviosidade) e sociais (presença do macho) e, internos (hormonais). Os estímulos ambientais ou sociais captados pelos receptores sensoriais que encaminham essas informações via cerebral, ativando-se as glândulas endócrinas que agem principalmente, nas gônadas, estimulando-as a produção de hormônios esteróides (Romagosa, 2009). Estes hormônios, responsáveis pela maturação, estão presentes nos peixes no ambiente natural ou quando cativos, cujas quantidades variam sazonalmente e durante o ciclo reprodutivo. Os fatores ambientais que influenciam na desova estão diretamente relacionados a temperatura da água (26-29°C) e aumento da precipitação pluviométrica (estação chuvosa) concomitantemente, aos maiores valores do índice gonadossomático durante a maturação das gônadas (Romagosa, 1991).

A maturação final e desova dos gametas de *P. mesopotamicus*, quando mantidos em cativeiro, é realizada por meio de manipulação hormonal sobre as gônadas (com injeção de gonadotropinas), com o uso de hormônios hipotalâmicos e seus análogos, uma vez que, o processo de maturação gonadal e desova não se completam (Bernardino e Lima, 1999). Para isso, é realizada a seleção de reprodutores, onde são consideradas as características reprodutivas externas, nas fêmeas (abdome abaulado, macio, papila urogenital saliente e avermelhada) e, nos machos (fluidez do sêmen sob leve compressão do abdome) (Teodoro e Ferraz de Lima, 1986).

Atualmente o principal agente indutor da maturação final e desova, aplicados em reprodução artificial de espécies nativas brasileiras é o extrato bruto de pituitária de carpa e salmão (Zaniboni-Filho e Weingartner, 2007). Este protocolo consiste na aplicação (intramuscular ou intraperitoneal) de 5,5 mg.Kg⁻¹ é aplicado em duas doses (0,5 e 5,0 mg.Kg⁻¹) para fêmeas, e 1,0 a 3,0 mg.Kg⁻¹ (dose única) para machos, em intervalos de 10 a 12 horas. O momento que deve ser realizada a desova ou extrusão dos ovos baseia-se nas unidades térmicas acumuladas (UTA) ou horas-grau, que para pacu foi de 275h⁰C na região Sudeste do Brasil (Romagosa, 1991; Bernardino e Lima, 1999).

Associado com suas características reprodutivas e o relativo domínio da técnica de reprodução artificial, em meados dos anos oitenta, surgiu o interesse de desenvolver um pacote tecnológico para a criação do *P. mesopotamicus*. Com isso, surgiu à necessidade do prolongamento da vida útil dos gametas masculinos, que tem sido implementado com sucesso (Castagnolli e Zuim, 1985; Romagosa et al., 1985; Chabalin e Neves, 1996; Miliorini, 2002; Carolsfeld, 2003).

O *P. mesopotamicus* tem sido adotado como espécie modelo para realizar estudos de criopreservação de embriões por meio de técnicas de congelamento (Streit, 2005; Neves, 2008) e resfriamento (Streit et al., 2007). A aplicação de novas biotecnologias voltadas para o aperfeiçoamento do manejo reprodutivo dessa espécie permitirá o incremento da produção aquícola, criando condições para atrair novos investidores, gerando alternativas de emprego e renda, diminuindo a pressão sobre os estoques pesqueiros e várzeas, além de diminuir os custos com a importação de pescado (Ostrensky et al., 2008).

3.2 Características e fases de desenvolvimento dos embriões

Em peixes, o sucesso do processo de embriogênese depende da qualidade dos ovos, ou seja, das características intrínsecas, fisiológicas e metabólicas. A qualidade dos ovos pode afetar a resistência dos embriões quando expostos a substâncias químicas. Por exemplo, ovos mais resistentes geram embriões de boa qualidade, entretanto, os mais sensíveis, em geral resultam em baixa qualidade (Lahnsteiner, 2008). Todavia, para as espécies de peixes nativos sul-americanos são raras as informações encontradas na literatura, sendo necessário conhecer bem as características durante o desenvolvimento dos embriões para então submetê-los a criopreservação.

Em cativeiro, após a hidratação, os ovos de *P. mesopotamicus* são transferidos para incubadoras (60 a 200L), com fluxo aberto de água, simulando o movimento dos ovos no ambiente natural (Romagosa, 1991). Estes ovos recém-fertilizados apresentam diâmetro que variam de 1,25 a 2,69 mm (Nakatani et al., 2001; Tomiita et al., 2008).

Os embriões, mesmo sendo provenientes do mesmo casal de reprodutores, podem apresentar diferenças durante o desenvolvimento, relacionando-as principalmente, a temperatura da água no período de incubação (Landinez et al., 2004), além da quantidade de vitelo presente no ovo, pois, quanto maior a quantidade, mais lenta será a velocidade no desenvolvimento embrionário (Kimmel et al., 1995).

Os ovos de *P. mesopotamicus* são telolécitos, apresentando diferenças entre os dois pólos, animal e vegetal, visíveis ao final da hidratação, sendo este último processo com a duração de aproximadamente um minuto (Ribeiro et al., 1995). Estes autores descreveram que o vitelo permanece concentrado no pólo germinativo, com citoplasma e suas organelas localizadas no pólo animal, considerada do tipo meroblástico ou parcial.

O desenvolvimento embrionário do *P. mesopotamicus* foi caracterizado por Nakatani et al. (2001) nas seguintes fases: (1) clivagem inicial, onde ocorre a formação das primeiras células; (2) embrião inicial, a partir do momento que começa a diferenciação do embrião; (3) cauda livre, esta se desprende do vitelo e, (4) embrião final, completamente formado, pronto para eclosão. Cada fase embrionária possui suas particularidades, que vão desde o tamanho do vitelo ao complexo sistema de membranas que variam com o decorrer do desenvolvimento. Zhang et al. (2003) afirmam que durante o processo ontogenético podem ocorrer “falhas” que inviabilizam o sucesso da criopreservação.

Hagedorn et al. (1998) descreveram que embriões de zebrafish, *Danio rerio* como outras espécies de peixes teleósteos, são compostos por dois compartimentos celulares, vitelo e blastoderme. O principal componente do vitelo é a vitelogenina, uma lipofosfoproteína (aproximadamente 400 kda), armazenada nas membranas dos ovos. No início do desenvolvimento, a blastoderme forma uma placa celular na região do vitelo, ocorrendo a multiplicação das células. A partir da fase de 128 células iniciam o movimento de epibolia, em que a blastoderme envolve o vitelo, até revesti-lo completamente (100% de epibolia). Subjacente a blastoderme, está a camada sincicial do vitelo (multinucleada), que substitui a fina camada citoplasmática que o envolvia. A partir daí reveste o vitelo atingindo o embrião em 50 a 70% do movimento de epibolia.

Para o pacu as etapas seguintes ao fechamento do blastóporo, caracterizadas pelo processo de organogênese, têm início com a formação do plano do corpo do embrião. Pode-se observar a segmentação, que é identificada pelo número de sômitos visíveis na região caudal. A partir daí, a cauda se destaca do vitelo, há o aparecimento da vesícula óptica e, em seguida, além da cauda bem alongada, a porção final do tubo digestório está evidente, completando o desenvolvimento do embrião para o momento da eclosão, cerca de 17 horas pós-fertilização, com médias de temperatura da água de $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Tomiita et al., 2008).

O vitelo, a blastoderme e camada sincicial do vitelo são estruturas embrionárias e além delas, o embrião de teleósteos é composto por outras estruturas extra-embrionárias como, espaço perivitelinico e córion (Neves, 2008), como representado na Figura 1. O córion é uma camada não celular que envolve o embrião, composto na maior parte por glicoproteínas, sendo considerado uma barreira que impede o movimento de água e soluto para dentro e fora das membranas que envolvem o embrião (Hagedorn et al., 1997).

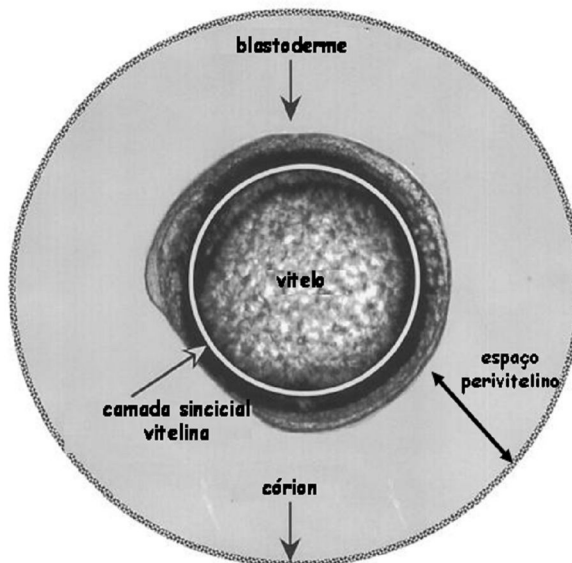


Figura 1. Representação dos principais compartimentos do embrião (vitelo, camada sincicial do vitelo e blastoderme) e estruturas extra-embriônicas (espaço perivitelínico e córion) de peixes teleosteos. Fonte: (Hagedorn et al., 1997, adaptado por Neves, 2008).

A caracterização dos ovos pode ser determinada também, pelo diâmetro do córion e do vitelo, estruturas do vitelo, tamanho do espaço perivitelínico, forma e a cor (Nakatani et al., 2001). Ainda, o espaço perivitelínico pode ser categorizado conforme sua participação no volume total do ovo, que pode ser restrito ($\leq 9,9\%$) a muito amplo ($\geq 30\%$), sendo que, em *P. mesopotamicus* é considerado amplo (25,41%) segundo os mesmos autores.

Os embriões de peixes quando submetidos à criopreservação apresentam problemas principalmente relacionados à: (1) permeabilidade das paredes dos ovos e (2) mecanismo de bombeamento osmótico (Hagedorn et al., 1997).

Pesquisas apontam taxas de permeabilidade inferiores nos embriões de peixes quando comparados aos embriões de *drosophilas* (Liu et al., 1989) e ratos (Leibo, 1973). Entretanto, os problemas causados pela osmorregulação são, na maioria, devido à quantidade de água retida nos embriões de peixes. Hagedorn et al. (1997) por meio da técnica de microscopia eletrônica, mensuraram a cinética do volume da água líquida de 58%, sendo que 61% do volume total encontra-se no vitelo, e o restante (39%) na blastoderme.

3.3 Criopreservação e crioprotetores utilizados em embriões de peixes

Criopreservação é uma técnica pela qual, células viáveis, tecidos e organismos podem ser mantidos, com metabolismo celular em estado quiescente, por períodos indeterminados. Porém, as consequências da exposição de células vivas a baixas temperaturas são inúmeras, sendo que, as causas das injúrias podem ter origem no momento da refrigeração, quando expostos a temperaturas próximas a zero, até o congelamento, que chega geralmente a -196°C (Zhang et al., 2007).

Os primeiros trabalhos com criopreservação de células vivas foram realizados por Polge et al. (1949) com espermatozoides de frango, a partir do qual foram surgindo novos relatos, entre eles, com embriões de camundongos na década de 70 (Whittingham et al., 1972). Atualmente a criopreservação de embriões de mamíferos é bem estabelecida, o que tem despertado o interesse da aplicação desta técnica em embriões de peixes. Entretanto, como há inúmeras particularidades nos embriões de espécies aquáticas, esta técnica não tem sido elucidada.

O sucesso na criopreservação de embriões de peixes poderia trazer muitos benefícios, como por exemplo, contornar os impactos ambientais negativos. Dessa forma, gametas coletados em programas de reprodução de populações de peixes silvestres ou mantidos em cativeiros, podem ser utilizados para a conservação de recursos genéticos e na condução de estudos de melhoramento animal, quando conservados por curto ou longo período (Gorman, 2000). Adicionalmente, esta tecnologia poderia fornecer embriões de diferentes espécies de peixes em determinadas estações do ano quando não desovam naturalmente (Janik et al., 2000) e, conseqüentemente, permitir o aumento da produção piscícola em cativeiro.

Para que as células sejam mantidas em baixas temperaturas é essencial a utilização de agentes crioprotetores, pois, na sua ausência ocorre a formação de cristais de gelo, considerados letais para as células (Polge et al., 1949; Leibo, 2000). Por outro lado, apesar de necessário, a sua toxidez pode provocar a mortalidade das células durante a entrada ou saída no seu interior (Chao e Liao, 2001).

Os crioprotetores podem ser divididos em duas categorias de acordo com sua ação, (1) intracelular e, (2) extracelular. Os intracelulares são compostos orgânicos responsáveis por proteger as organelas das células durante o resfriamento. São moléculas com baixo peso molecular, que apresentam facilidade para atravessar as membranas celulares,

destacando-se para os embriões de peixes, o metanol e o dimetilsulfóxido (DMSO). Por outro lado, o crioprotetor extracelular é formado por macromoléculas e açúcares cuja função é reduzir a formação de gelo, facilitar a desidratação das células e proteger a membrana celular. São moléculas com alto peso molecular não podendo permear as células, sendo que, geralmente, o mais utilizado em embriões de peixes é a sacarose (Niemann, 1991).

Desde meados de 2005, no Brasil, tem sido desenvolvidos experimentos relacionados ao resfriamento e criopreservação de embriões (Streit Jr, 2005; Ninhaus-Silveira et al., 2006; Streit et al., 2007; Neves, 2008). Pesquisas relacionadas ao conhecimento do potencial tóxico dos crioprotetores nas espécies de peixes nativos foram desenvolvidas por Ninhaus-Silveira et al. (2006) com embriões de curimatá, *Prochilodus lineatus*. Os autores obtiveram 0% na estimativa das taxas de eclosão de embriões, após tê-los submetidos a vários crioprotetores, durante um, cinco e 15 minutos e, em seguida, congelados por 24 horas. Os testes com crioprotetores citados anteriormente por Streit Jr. (2005) com *P. mesopotamicus*, observaram toxidez maior quando utilizaram o DMSO em relação ao metanol.

O protocolo de resfriamento para as espécies de peixes nativos sul-americanos foi sugerido por Streit Jr. et al. (2007) para embriões de pacu, *P. mesopotamicus*. Combinações de crioprotetores intra (17,1% de sacarose) e extracelulares (9% de metanol), para o resfriamento a -8°C estocados, por seis horas, recomendando a utilização de tal solução para a realização deste protocolo.

3.4 Sensibilidade dos embriões de peixe ao frio

De modo geral, o resfriamento de ovos e embriões de peixes tem sido utilizado como uma estratégia de conservação por tempo limitado (Zaniboni-Filho e Nuñez, 2004). Um dos principais fatores que dificultam o congelamento de embriões de peixes é a alta sensibilidade ao frio (Stoss, 1983). Em função disso, inúmeros estudos foram desenvolvidos para observar, em diferentes espécies de peixes, os danos causados aos embriões, quando submetidos a baixas temperaturas (Zhang e Rawson, 1995; Dinnyes et al., 1998; Calvi e Maisse, 1998; Liu et al., 2001).

O conhecimento do estágio de desenvolvimento dos embriões de peixes a serem utilizados é um importante critério para o sucesso na criopreservação, pois, muitos estudos

reportaram que a sensibilidade ao frio é dependente do estágio embrionário (Maddock, 1974; Haga, 1982; Jaoul e Roubaud, 1982; Roubaud et al., 1985; Begovac e Wallace, 1986; Liu et al., 1993; Zhang e Rawson, 1995; Hagedorn et al., 1997). Outro fator que deve ser levado em consideração são as curvas de resfriamento, como no experimento desenvolvido por Zhang et al. (2003) com *Danio rerio*, utilizando 1, 30 e 300°C por minuto, onde ficou evidente sua influência nas taxas de sobrevivência.

Zaniboni-Filho e Nuñez (2004) afirmam que o sucesso do procedimento de resfriamento é variável e dependente da utilização de diluidores e ou crioprotetores específicos, e dos estudos que devem ser desenvolvidos especificamente para cada espécie. Deste modo, verifica-se que o resfriamento, tanto para sêmen quanto para ovos e embriões de peixes, é uma alternativa viável para a conservação em curto prazo.

3.4.1 Estádio embrionário dependente

A sensibilidade ao frio depende do estágio de desenvolvimento embrionário foi verificado para diferentes espécies como *Oncorhynchus mykiss* (Maddock, 1974; Haga, 1982), *Pimephales promelas* (Begovac, 1986), *Cyprinus carpio* L. (Jaoul e Roubaud, 1982; Roubaud et al., 1985), *Danio rerio* (Zhang e Rawson, 1995; Hagedorn et al., 1997) e *Carassius auratus* (Liu et al., 1993), entre outras. A maioria desses estudos revelou que os embriões em estádios iniciais do desenvolvimento embrionário são mais sensíveis as injúrias causadas pelo frio.

A alta sensibilidade a criopreservação nas primeiras fases embrionárias foi justificada por Lahnsteiner (2008) pelas seguintes razões: (a) rápido processo de diferenciação celular afetada pelos crioprotetores; (b) pós-fertilização - a formação do ovo não é completa, isto é, o endurecimento do córion, entrada de água, osmorregulação e, portanto, estádios ontogenéticos iniciais podem ser altamente permeáveis aos crioprotetores comparado aos estádios mais avançados e, (c) baixo potencial de desintoxicação das vias metabólicas reguladoras nos estádios ontogenéticos iniciais, que por se encontrarem pouco desenvolvidos, são incapazes de compensar o efeito tóxico dos crioprotetores.

Cada estágio embrionário das diferentes espécies de peixes possui suas particularidades, entre elas, a permeabilidade das membranas. Hagedorn et al. (1997) examinaram a multicompartimentalização de embriões de zebrafish mostrando a permeabilidade individual de cada compartimento do embrião. Estes experimentos

identificaram que a camada sincicial vitelina é uma barreira para o movimento do crioprotetor para dentro do embrião. No decorrer do desenvolvimento embrionário esta camada se forma e substitui a camada citoplasmática do vitelo (Betchaku e Trinkhaus, 1978), evidenciando as especificidades dos estádios iniciais em relação à compartimentalização.

Além disso, segundo Calvi e Maisse (1998) durante o processo de desenvolvimento embrionário ocorre a redução do tamanho das células devido ao aumento da clivagem proporcionando melhor relação entre a superfície/volume. Sendo assim, os autores afirmam que a permeabilidade dos crioprotetores nos estádios embrionários mais avançados foi melhor em relação a fase inicial.

A influência dos estádios embrionários foi evidenciada por Ahammad et al. (2003) trabalhando com embriões de *Labeo rohita* em três estádios distintos (9, 12 e 15 horas pós-fertilização), utilizando dois crioprotetores (metanol e propilenoglicol), em diferentes tempos de estocagem (1-48 horas) e temperaturas (-4°C e temperatura ambiente, 28°C). Os autores observaram, por meio da estimativa das taxas de eclosão, que as melhores condições para estocagem dos embriões, em temperatura abaixo de zero, foi observada no estágio embrionário intermediário.

3.4.2 Curvas de resfriamento

A desidratação das células durante o resfriamento depende diretamente da velocidade de redução da temperatura. Curvas de resfriamento ótimas variam consideravelmente, por causa das diferenças entre os tipos de células, ou seja, a quantidade de água intracelular, tamanho da célula, permeabilidade da membrana para a entrada e saída de água e, o coeficiente de temperatura (Hagedorn et al., 1997).

Quando o resfriamento é suficientemente lento, as células são capazes de perder água rapidamente por osmose, suportando a desidratação e mantendo o equilíbrio do potencial químico da água e da solução intracelular com a água extracelular (Meryman, 1977). Porém, este mesmo autor mostra que mesmo assim, a exposição das células a solução crioprotetora causa um estresse osmótico, que dependendo da concentração, duração e temperatura de exposição à solução, pode levar a célula a entrar em colapso. Por outro lado, se o resfriamento for rápido, o potencial químico da água e da solução extracelular diminui mais rápido do que o da água intracelular, resultando em água

intracelular remanescente que, eventualmente, forma gelo intracelular, que muitas vezes é letal para as células (Zhang et al., 2007).

Nos últimos anos, vários métodos de congelamento de embriões bovinos se baseiam em uma curva de diminuição da temperatura padrão desenvolvido por Willadsen et al. (1976). Esses trabalhos correlacionam à queda de temperatura em função do tempo obtido com velocidade de 3°C a 1°C/minuto e, a indução à cristalização da solução crioprotetora “seeding” na temperatura de -7°C com gradativa queda até -33 a -35°C e, posteriormente, armazenado em nitrogênio líquido (N₂).

Estudos realizados com embriões de peixes, *Danio rerio* mostraram o efeito das curvas de resfriamento lento (1°C/minuto), intermediário (30°C/minuto) e rápido (~300°C/minuto), utilizando-se como crioprotetor o metanol, em diferentes estádios embrionários (Zhang et al., 2003). Os autores verificaram que o efeito do crioprotetor metanol foi mais pronunciado quando os embriões foram submetidos ao resfriamento lento, não apresentando diferenças significativas em relação ao controle não resfriado. Enquanto, nas demais curvas de resfriamento, a taxa de eclosão após o resfriamento foi significativamente menor.

O conhecimento dos diferentes estádios embrionários de espécies de peixes tropicais, bem como, a submissão desses as diferentes curvas de resfriamento é necessário para estabelecer um protocolo de resfriamento, além de servir como base para o congelamento, conhecendo-se injúrias causadas pela queda da temperatura.

Referências bibliográficas

AHAMMAD, M. M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B. B. Stage-dependent hatching responses of rohu (*Labeo rohita*) embryos to different concentrations of cryoprotectants and temperatures. **Cryobiology**, v.46, p.1-16, 2003.

AHAMMAD, M. M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B. B. The hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos in response to exposure to different concentrations of cryoprotectant at low temperatures. **Cryobiology**, v.44, p.114-121, 2002.

AHAMMAD, M. M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B. B. Effect of different concentrations of cryoprotectant and extender on the hatching of Indian major carp

- embryos (*Labeo rohita*, *Catla catla*, and *Cirrhinus mrigala*) stored at low temperature. **Cryobiology**, v.37, p.318-324, 1998.
- BART, A. New approaches in cryopreservation of fish embryos. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK P. M. **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000, p.179-1871.
- BEGOVAR, P. C.; WALLACE, R. C. Vitelline envelop proteins in the pipefish. **Journal of Morphology**, v.193, p.117-133, 1986.
- BERNARDINO, G.; LIMA, V. A. Situação da criação de *Colossoma* e *Piaractus* no sudeste do Brasil (1988-1991). In:__. **Criação de Colossoma e Piaractus no Brasil**. Brasília: Ibama, 1999, p.262-266.
- BETCHAKU, T.; TRINKHAUS, J. P. Contact relations, surface activity, and cortical microfilaments of marginal cells of the enveloping layer and of the yolk syncytial and yolk cytoplasmic layers of *Fundulus* before and during epiboly. **Journal Experimental Zoology**, v.206, p.381-426, 1978.
- CALVI, S. L.; MAISSE, G. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blastomeres influence of embryos (*Scophthalmus maximus*). **Cryobiology**, v.36, p.255-262, 1998.
- CAROLSFELD, J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, v.63, p.472-489, 2003.
- CASTAGNOLLI, N. Espécies exóticas próprias para a piscicultura. In: CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 1992, p.71-96.
- CASTAGNOLLI, N.; ZUIM, S. M. Consolidação do conhecimento adquirido sobre pacu, *Colossoma mitrei*-Berg, 1895. **Boletim Técnico do CEPTA**, v. 5. 1985, p.1-2.
- CHABALIN, E.; NEVES, E. M. Análise econômica da criação de pacu sob condições de risco. **Boletim técnico do CEPTA**, v. 3. 1996. p.53-60.
- CHAO, N. H.; LIAO, I. C. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. **Aquaculture**, v.197, p.161-189, 2001.
- DINNYES, A. B.; URBÁNYI, B.; Baranyai, I. Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants work in progress. **Theriogenology**, v.50, p.1-13, 1998.

- FALCONER, D.S. **Introdução a genética quantitativa**. Viçosa: UFV, 1987. 279 p.
- GODOY, M. P. Peixes do Brasil: subordem Characoidei: Bacia do rio Mogi-Guaçu. Piracicaba: Franciscana, 1975. v.1-4. 216p.
- GONÇALVES, F. D.; URBINATI, E. C. Growth and metabolic stores of pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1987), as affected by fasting and type of diet. **Scientia Agricola**, 2005.
- GORMAN, O. T. Ecological and genetic considerations for collection of gametas from wild fishes. In: TIERSCH, T. R. e MAZIK, P. M. **Cryopreservation in Aquatic Species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000, 139p.
- GWO, J. C.; STRAWN, K.; ARNOLD, C. R. Change in mechanical tolerance and chilling sensitivity of red drum (*Sciaenopus ocellatus*) embryos during development. **Theriogenology**, v.43, p.1155-1161, 1995.
- HAGA, Y. On the subzero temperature preservation of fertilized eggs of rainbow trout. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v.48, p.1569-1572, 1982.
- HAGEDORN, M.; F. W. KLEINHANS. Problems and prospects in cryopreservation of fish embryos. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. **Cryopreservation in aquatic species**, Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000, p.161-178.
- HAGEDORN, M.; HSU, E.; KLEINHANS, F. W.; WILDT, D. E. New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation. **Cryobiology**, v.34 p.335-347, 1997.
- HAGEDORN, M.; KLEINHANS, F. W.; ARTEMOV, D.; PILATUS, U. Characterization of a major Permeability Barrier in the Zebrafish Embryo. **Biology of Reproduction**, v.59, p.1240-1250, 1998.
- HOLMBERG, E. L. Sobre algunos peces nuevos e poco conocidos de la República Argentina. **Revista Argentina de História Natural**, Buenos Aires, p.180-193, 1887.
- IBAMA. **Estatística de pesca 2005: Brasil, grandes regiões e unidades da federação**. Brasília: IBAMA, 2007.

- JANIK, M., KLEINHAUS, F. W.; HAGEDORN, M. Overcoming a permeability by microinjecting cryoprotectants into zebrafish embryos (*Brachidanio rerio*). **Cryobiology**, v.41, p.25-34, 2000.
- JAOUL, A.; ROUBAUD, P. Resistance de l'oeuf de carp commune (*Cyprinus carpio* L. Cyprinidae) a des chocs thermiques chauds ou froids. **Canadian Journal Zoology**, v.60, p.3409-3419, 1982.
- KIMMEL, C. B., BALLARD, W. W.; KIMMEL, S. R. Stages embryonic developmental of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v.203, p.60-67, 1995.
- LAHNSTEINER, F. The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, v.69, p.384-396, 2008.
- LANDINEZ, M. A., SENHORINI, J. A.; SANABRIA, A. I. Desenvolvimento embrionário de piracanjuba (*Brycon orignyanus*). **Boletim técnico do CEPTA**. v. 17, 2004, p.1-12.
- LEIBO, S. P. Image formation by induced local interactions: Examples employing nuclear magnetic resonance. **Nature**, v.242, p.190-191, 1973.
- LEIBO, S. P. Sources of variation in cryopreservation. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. **Cryopreservation in aquatic species**, Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000, p.75-83.
- LIU, K.; PITT, R. E.; STEPONKUS, P. L. Osmotic behavior of *Drosophila melanogaster* embryos. **Cryobiology**, v.26, p.453-471, 1989.
- LIU, K.; CHOU, T.; LIN, H. Cryosurvival of goldfish embryos after subzero freezing. **Aquatic Living Resources**, v.6, p.145-153, 1993.
- LIU, X.H.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Effect of cooling rate and partial removal of yolk on the chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, v.55, p.1719-1731, 2001.
- MADDOCK, B. G. A technique to prolong the incubation period of brown trout ova. **Progressive Fish Culturist**, v.36, p.219-222, 1974.
- MERYMAN, H. T.; WILLIAMS, R. T.; DOUGLAS, M. S. J. Freezing injury from "solution effect" and its prevention by natural or artificial cryoprotectant. **Cryobiology**. v.14, p.287-302, 1977.

- MILIORINI, A. B. Resfriamento de sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) à 4°C, utilizando diferentes concentrações de dimetilsulfóxido. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.209-211, 2002.
- MORRIS, G. J.; WATSON, P. F. Cold shock injury-a comprehensive bibliography. **Cryo-Letters**, v.5, p.352-372, 1984.
- NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P. V.; MAKRAKIS, M. C.; PAVANELLI, C. S. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: EDUEM, 2001, 378p.
- NEVES, P. R. **Utilização de crioprotetores intra e extracelulares em embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. Tese de Doutorado (Doutorado em Zootecnia), Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2008, 71p.
- NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock current status and research needs. **Theriogenology**, v.35, p.109-124, 1991.
- NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes, Prochilodontidae). **Zygote**, v.14, p.217-229, 2006.
- OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. **Aqüicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília: Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), 2008. v. 1. 276 p.
- POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. **Nature**, v.164, p.666, 1949.
- RIBEIRO, C. R.; SANTOS, H. S.; BOLZAN, A. A. Estudo comparativo da embriogênese de peixes ósseos (pacu, *Piaractus mesopotamicus*; tambaqui, *Colossoma macropomum* e híbrido tambacu). **Revista Brasileira de Biologia**, v.55, p.65-78, 1995.
- ROMAGOSA, E. Avanços na reprodução de peixes migradores. In: Cyrino et al. (Org.). **Tópicos Especiais em Piscicultura Tropical Intensiva**. 2009, v. 3, no prelo.
- ROMAGOSA, E. **Mudanças morfológicas (microscopia de luz e eletrônica) das gônadas do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), durante o ciclo**

- reprodutivo, em condições de confinamento.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Rio Claro, São Paulo, 1991, 177p.
- ROMAGOSA, E.; PAIVA, P.; GODINHO, H. M. Desenvolvimento dos ovócitos de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1987)(=*Colossoma mitrei* Berg, 1985) em condições de cultivo intensivo. **Ciência e Cultura**, n.1, v.63, p.60-64, 1988.
- ROMAGOSA, E.; PAIVA, P.; CESTAROLLI, M. A. Reprodução induzida do pacu *Colossoma mitrei* Berg, 1895, mantidos em condições de cultivo intensivo. **Ciência e Cultura**, n.7, v.37, p.849, 1985.
- ROUBAUD, P.; CHAILLOU, C.; SJAFEI, D. Variations cycliques de la toletance a un thermique froid appliqué au cours de la segmentation de lembryon de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.). **Canadian Journal of Zoology**, v.63, p.657-663, 1985.
- SERRALHEIRO, P.C. Criopreservação de sêmen de peixes marinhos. Disponível no site: Instituto de Pesca, Jan/2008 (www.pesca.sp.gov.br).
- SIROL, R.N.; BRITTO, S.G. Conservação e manejo da ictiofauna: Repovoamento. In: NOGUEIRA, M.G.; HENRY, R.; JORCIN, A. (Ed). **Ecologia de reservatórios: Impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas**. São Carlos: RIMA, 2006, p.275-284.
- STOSS, J. Fish gamete preservation and spermatozoa physiology. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. **Fish Physiology**. Orlando: Academic Press, 1983, p.305-350.
- STREIT JR, D. P. **Crioprotetores e resfriamento de embriões de pacu (*P. mesopotamicus*)**. Tese de Doutorado (Doutorado em Zootecnia), Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2005.
- STREIT, D. P.; DIGMAYER, M.; RIBEIRO, R. P.; SIROL, R. N.; MORAES, G. V. e GALO, J. M. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1119-1202, 2007.

- TEODORO, A. J.; FERRAZ DE LIMA, J. A. Observações práticas sobre a reprodução induzida de pacu, *Colossoma mitrei* (liberação espontânea de óvulos). In: **Simpósio Brasileiro de Aquicultura**, n.4, p.99-112, 1986.
- TOMIITA, F. I.; GONÇALVES, L. U.; ARAÚJO, A. H.; FORNARI, D. C.; VIEGAS, E. M. Desenvolvimento embrionário de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Anais do Aquaciência 2008**. Maringá, 2008.
- WHITTINGHAM, D. G.; LEIBO, S. P.; MAZUR, P. Survival of mouse embryos by frozen to 196°C and -296°. **Science**, v.178, p.411-414, 1972.
- WILLADSEN, S. M.; POLGE, C.; ROWSON, L. E. Deep-freezing of sheep embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.46, p.151-154, 1976.
- ZANIBONI-FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.367-373, 2007.
- ZHANG, T.; RAWSON, D. M.; MORRIS, G. J. Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Aquatic Living Resources**, v.6, p.145-153, 1993.
- ZHANG, T.; RAWSON, D. M.; PEKARSKY, I.; BLAIS, I.; LUBZENS, E. Low-temperature preservation of fish gonad cells and oocytes. In: BADIN, P. J.; CERDÀ, J. e LUBZENS, E. **The fish oocytes: from basic studies to biotechnological applications**, Springer, 2007. p.411-436.
- ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology**, v.32, p.239-246, 1995.
- ZHANG, T.; LIU, X.; RAWSON, D. M. Effects of methanol and developmental arrest on chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, v.59, p.1545-1556, 2003.

IV. RESFRIAMENTO DE EMBRIÕES DE PACU, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887) EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO E TEMPOS DE ESTOCAGEM

COOLING OF EMBRYOS OF PACU, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887), IN DIFFERENTS STAGES OF DEVELOPMENT AND STORAGE TIME

Resumo

O objetivo do trabalho foi acompanhar os efeitos durante o resfriamento, em quatro estádios de desenvolvimento embrionário de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, em dois tempos de estocagem, seis e 10 horas. Embriões em quatro estádios de desenvolvimento (blastoderme, 64 células - 1,4-horas pós-fertilização, hpf; 25% do movimento de epibolia - 5,2-hpf; fechamento do blastóporo - 8-hpf e; aparecimento da vesícula óptica - 13,3-hpf) foram expostos a uma solução crioprotetora contendo metanol (10%) e sacarose (0,5M). A seguir, os embriões passaram por curva de resfriamento de 1°C por minuto até -8°C, onde foram mantidos nos dois períodos de estocagem. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, as taxas de eclosão dos embriões foram avaliados para cada tratamento, com seis repetições, comparando-se com o controle que não foi resfriado. O número total de larvas estimadas para as duas primeiras fases do desenvolvimento ontogenético (1,4- e 5,2-hpf) foi estatisticamente menor que nas demais fases. Entretanto, os estádios de 8 e 13,3-hpf não diferiram entre si (49,90%±6,71 e 55,24%±6,71), respectivamente, encontrando-se mais próximas ao controle (90,67%±6,56). Além disso, a permeabilidade das membranas, estimada através do diâmetro dos embriões, variou estatisticamente do controle para seis e 10 horas de estocagem, quando utilizado os estádios de 1,4 e 5,2-hpf, enquanto para os demais não houve diferença. Da mesma forma, pode-se verificar que houve correlação negativa entre o número total de larvas e o diâmetro do embrião. Sendo assim, a utilização dos estádios embrionários de 8 e 13,3-hpf são os mais recomendados para o resfriamento de embriões de pacu estocados até 10 horas, a -8°C.

Palavras-chave: Criopreservação, desenvolvimento ontogenético, peixes sul-americanos, sobrevivência larval.

Abstract

The objective of this research was to verify the effects of cooling of embryos of pacu, *Piaractus mesopotamicus*, in four stages of development, for two stocking periods. The stages of embryo development were: at blastoderm, ~64 cells - 1.4 hours after fertilization (haf); at 25% of the epiboly movement - 5.2 haf; at blastoporous closing - 8.0 haf; and at optical vesicle appearing - 13.3 haf. Embryos were exposed to a cryoprotectant solution containing methanol (10%) and sucrose (0.5M). After that, embryos were submitted to a cooling curve (-1°C/min) until -8°C and then kept at -8°C for six or ten hours. Also, for each stage of embryo development a control group with not cooled embryos was used to compare the eclosion rates. The total number of larvae estimated for the first two stages of ontogenetic development (1.4 and 5.2-haf) was lower compared to the other stages. There was no difference for the total number of larvae between the stages 8.0 e 13.3-haf (49.90%±6.71 and 55.24%±6.71, respectively). Therefore, the utilization of the embryonary stages of 8.0 and 13.3-haf are recommended for cooling pacu embryos stored up to 10 hours at -8 ° C.

Key-words: Cryopreservation, ontogenetic development, South American fish, larvae survival rates.

4.1 Introdução

O interesse pela conservação de gametas de peixes e sua aplicação na reprodução tem aumentado recentemente, diante do declínio dos estoques naturais, provocado pela pesca comercial [1]. Enquanto, pesquisadores vêm se dedicando a criopreservação de sêmen dos principais peixes de água doce sul-americanos como, por exemplo, o *Piaractus mesopotamicus* [2], *Prochilodus lineatus* [3], *Brycon amazonicus* [4], *Brycon orbignyianus* [5, 6], raros são os registros sobre a criopreservação de embriões de peixes em geral, bem como, de pacu, sendo que estudos tem se dedicado ao resfriamento como alternativa para conservação de embriões. Todavia, a otimização de protocolos de resfriamento e processos de avaliações padronizadas são ainda necessárias.

Em embriões de peixes um dos principais problemas associados a baixas temperaturas é atribuída a permeabilidade das membranas à água, aos crioprotetores e sensibilidade ao frio [7, 8, 9]. Sabe-se ainda que, tanto a permeabilidade das membranas, quanto a sensibilidade ao frio são dependentes do estágio embrionário utilizado no

momento do resfriamento [10]. Na maioria das espécies estudadas, como *Oncorhynchus mykiss* [11, 12], *Pimephales promelas* [13], *Cyprinus carpio* [14, 15], *Danio rerio* [8, 9] e *Carassius auratus* [16], os estádios de pós-gastrulação são menos sensíveis às injúrias causadas pelo resfriamento. Ainda, Hagedorn et. al [8] mostraram que a remoção do córion em embriões de *Danio rerio*, pela enzima pronase, não alterou a suscetibilidade ao frio.

Um dos fatores limitantes para criopreservação dos embriões de peixes é a alta sensibilidade observada nos estádios iniciais do desenvolvimento e que progressivamente diminui durante o desenvolvimento do embrião. Segundo Lahnsteiner [17] a causa dessa limitação pode ser justificada pelas seguintes razões: (a) rápido processo de diferenciação afetado principalmente pelos crioprotetores; (b) durante a pós-fertilização a formação do ovo não é completa, isto é, o endurecimento do córion influencia a entrada de água e a osmorregulação, portanto, os estádios ontogenéticos iniciais podem ser altamente permeáveis aos crioprotetores, quando comparado aos estádios mais avançados; (c) baixo potencial de desintoxicação das vias metabólicas reguladoras principalmente, nos estádios ontogenéticos iniciais, que se encontram pouco desenvolvidos e, são incapazes de compensar o efeito tóxico dos crioprotetores. Além disso, segundo Calvi e Maisse [18] trabalhando com *Oncoryinchus mykiss* citaram que durante o desenvolvimento embrionário ocorre a redução do tamanho das células devido ao aumento da clivagem proporcionando melhor relação entre a superfície e o volume. Sendo assim, os autores afirmam que a permeabilidade dos crioprotetores nos estádios embrionários mais avançados foi melhor em relação a fase inicial.

Esforços no desenvolvimento de métodos de criopreservação para espécies aquáticas focam quase que exclusivamente sobre o uso dos crioprotetores e sua permeabilidade [19]. Segundo os autores, estudos recentes têm mostrado que na ausência de crioprotetores tradicionais vem sendo utilizados crioprotetores intracelulares em baixa concentração.

Uma vez que cada espécie possui particularidades em relação ao desenvolvimento ontogenético, o presente estudo teve como objetivo verificar o efeito do resfriamento nos quatro estádios de desenvolvimento embrionário do *P. mesopotamicus*, em dois tempos de estocagem.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Origem dos embriões

Embriões de *P. mesopotamicus* foram coletados, em fevereiro de 2009, na Estação de Hidrologia e Aquicultura da DUKE ENERGY Brasil, Salto Grande, São Paulo, Brasil. Os reprodutores utilizados possuíam, em média, quatro anos de idade e, foram mantidos em tanques escavados a uma densidade de 0,4 kg de peixe por m². Foi utilizado um pool de ovos proveniente das desovas de seis casais, resultantes da indução hormonal. Para isso, foram injetados (intramuscular) 5,5 mg.Kg⁻¹ de extrato bruto de pituitária de carpa em duas doses (0,5 e 5,0 mg.Kg⁻¹), com intervalo de 12 horas para fêmeas, e 1,0 mg.Kg⁻¹ (dose única) para machos. Após 275 horas/grau ocorreu a extrusão dos gametas, e os ovos recém-fertilizados foram transferidas para incubadoras cônicas (7L) com fluxo contínuo de água.

A sequência de eventos ocorridos da fase de desenvolvimento do embrião até a eclosão de larvas foi acompanhada permitindo assim, avaliar como foi o desenvolvimento. A temperatura da água foi mantida em 27°C±1.

4.2.2 Delineamento experimental

Os ovos viáveis selecionados foram divididos em grupo controle e grupo tratamento (resfriamento em dois tempos de estocagem). Para isto os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, sendo que para o grupo controle houve três repetições. Para o grupo tratamento foi utilizado esquema fatorial, onde cada um dos quatro estádios embrionários passou por dois tempos de estocagem, com seis repetições. Da mesma forma, foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, para a análise morfométrica dos embriões, onde foram mensurados os quatro estádios embrionários (córion e embrião), sem passar por tratamento e após dois períodos de estocagem, com cinco repetições. Ainda, foi verificado se há correlação entre as variáveis: número total de larvas (LT) e diâmetro do embrião.

Cada unidade experimental foi composta por cem (100) embriões viáveis. ANOVA foi utilizada para verificar a comparação de médias, através do teste de Tukey ao nível de significância de 5%, bem como para analisar o coeficiente de correlação entre duas variáveis [20].

4.2.3 Grupo controle

O grupo controle foi utilizado para verificar a influencia da seleção de ovos viáveis, em momentos distintos do desenvolvimento ontogenético, na taxa de eclosão, mesmo sem passar por tratamento de resfriamento. Este grupo foi composto por quatro tratamentos, sendo que cada um representava os seguintes estádios embrionários [21]:

- Tratamento controle 1: blastoderme - 1,4-horas pós-fertilização (hpf), (~ 64 células);
- Tratamento controle 2: epibolia - 5,2-hpf (25% movimento de epibolia);
- Tratamento controle 3: fechamento do blastóporo - 8-hpf (90% movimento de epibolia);
- Tratamento controle 4: aparecimento da vesícula óptica no embrião - 13,3-hpf.

Para isso, foram utilizadas 12 incubadoras de 3L, com fluxo contínuo, sem passar por solução crioprotetora até o momento de eclosão das larvas (aproximadamente 18-hpf) (Fig. 1).

4.2.4 Estádios embrionários submetidos ao resfriamento

Para compor o grupo tratamento, embriões viáveis nos diferentes estádios embrionários (1,4; 5,2; 8 e 13,3-hpf) foram coletados das incubadoras, sendo que cada unidade experimental foi acondicionada em tubos vacutainer e recebeu uma solução crioprotetora contendo metanol (10%) e sacarose (0,5M). Em seguida, estes tubos foram levados a caixas de isopor e gelo, cuja temperatura foi constantemente controlada. Desta forma, os embriões passaram por uma curva de resfriamento, onde a temperatura caiu cerca de 1°C por minuto, até atingirem -8°C, sendo mantidos em dois tempos de estocagem, seis e 10 horas. Os tubos foram retirados do refrigerador, aclimatados por cinco minutos em água a temperatura ambiente, e em seguida transferidos para incubadoras de 3L. Cada tubo ocupou uma incubadora (3L) com fluxo de água contínuo, totalizando 48 incubadoras, onde permaneceram até completar o desenvolvimento embrionário (Fig. 1).

4.2.5 Avaliação da sobrevivência larval

Ao completar o desenvolvimento embrionário (cerca de 18-hpf), tanto o grupo controle, quanto o grupo tratamento, foram retirados das incubadoras para estimar o número total de larvas (LT) e ovos gorados (OG). O total de larvas foi subdividido em larvas: vivas (LV), mortas (LM) e não-eclodidas (LNE) (desenvolvimento embrionário incompleto).

4.2.6 Análise morfométrica dos embriões

Cem (100) embriões de cada grupo (controle e tratados em dois tempos de estocagem) nos quatro estádios embrionários (1200 embriões) foram coletados e conservados em formol tamponado [22]. Em um estereomicroscópio acoplado a câmera digital os embriões foram medidos, suas imagens digitalizadas e analisadas utilizando-se o software LEICA IM50 no Laboratório de Histologia e Embriologia Animal da FCAV/UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Realizaram-se medidas do diâmetro do córion e do embrião, sendo que, no estádio de aparecimento da vesícula óptica, foi mensurado o maior e o menor diâmetro do embrião, por não apresentar forma esferóide [23] (Fig. 2).

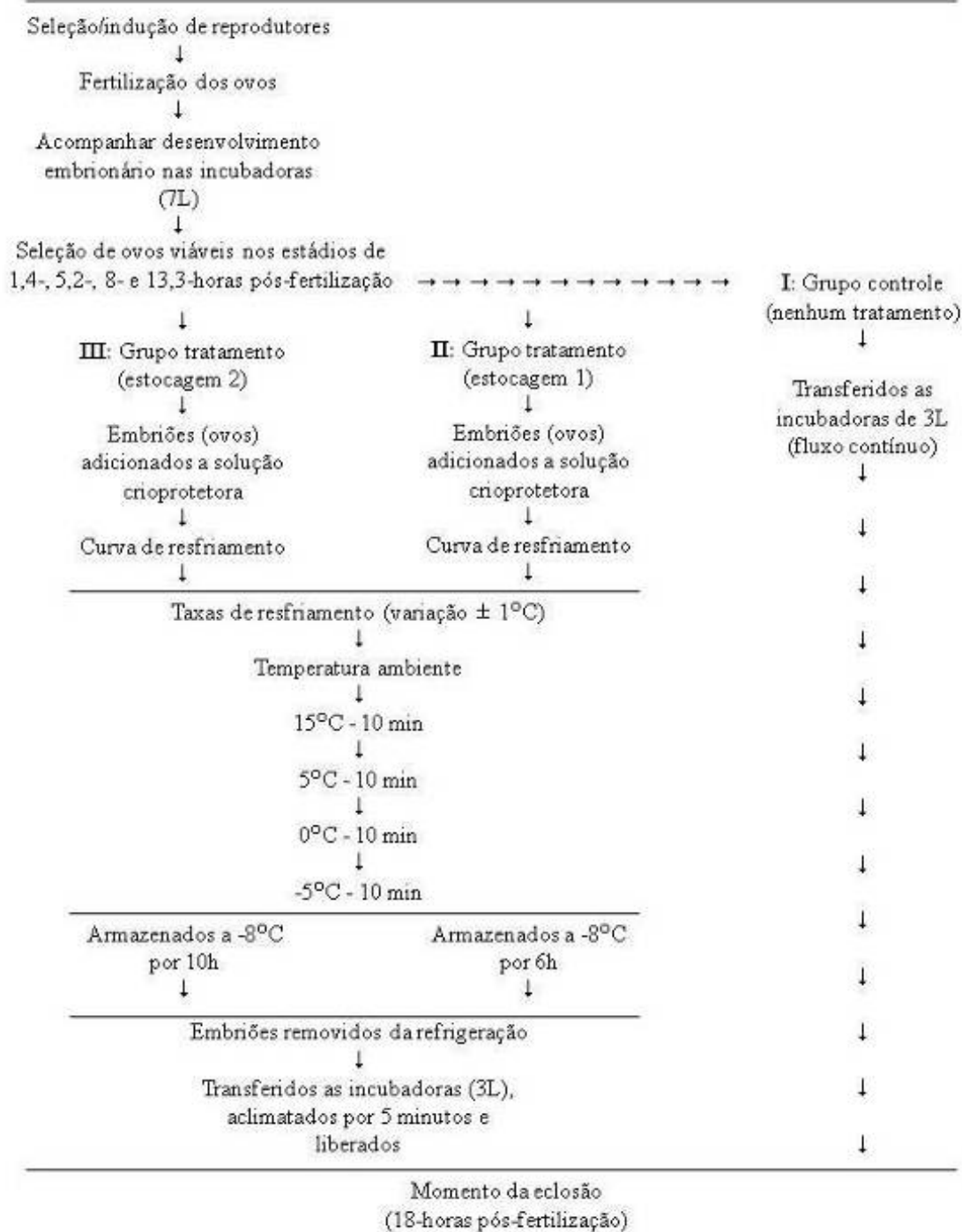


Fig. 1. Fluxograma do resfriamento de embriões de *P. mesopotamicus* nos quatro estádios embrionários em dois tempos de estocagem.

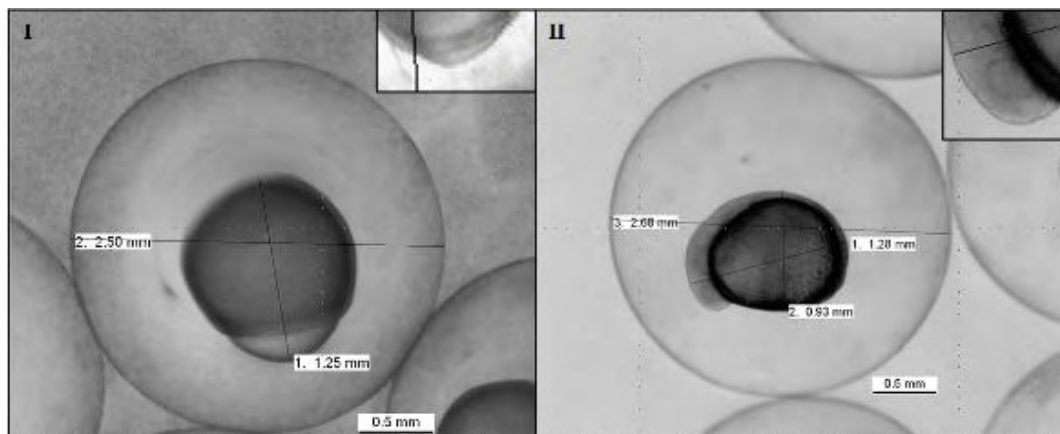


Fig. 2. Embriões de *P. mesopotamicus*. I: Fechamento do blastóporo (8-hpf): 1- diâmetro do embrião, 2 – diâmetro do córion. II: Aparecimento da vesícula óptica (13,3-hpf): 1-diâmetro maior do embrião, 2-diâmetro menor do embrião e, 3-diâmetro do córion. (Estereomicroscópio, 40X).

4.3 Resultados

4.3.1 Estudo controle

O percentual de LT, a partir dos ovos selecionados viáveis para os tratamentos do grupo controle, está apresentado na Tab. 1. Notou-se um significativo aumento ($p < 0,05$) de LT nos dois estádios de desenvolvimento mais avançados, na ordem: $5,2 < 1,4 < 8 < 13,3$ -hpf (Tab. 1). Observou-se que não houveram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os estádios embrionários para LV, LM e LNE. A média de LT para os quatro estádios embrionários foi de 90,67%, esta foi utilizada para comparação com o grupo tratamento, assim como as LV, LM, LNE e OG apresentados na Tab. 1.

Tabela 1. Porcentual de larvas (vivas, LV; mortas, LM; não-eclodidas, LNE; ovos gorados, OG) para os embriões de *P. mesopotamicus*, nos estádios embrionários de 1,4; 5,2; 8 e 13,3-hpf utilizados como controle.

Estádios embrionários	LT	LV	LM	LNE	OG
1,4-hpf	91,9%±3,77 ^{bc}	72,31±16,52	19,08±8,37	0,54±3,52	11,84 ^{bc} ±1,48
5,2-hpf	81,4%±1,38 ^c	61,38±16,52	10,00±8,37	10,00±3,52	18,62 ^c ±1,48
8-hpf	92,6%±3,72 ^{ab}	85,30±16,52	3,96±8,37	3,36±3,52	7,65 ^{ab} ±1,48
13,3-hpf	96,8%±0,85 ^a	74,32±16,52	20,84±8,37	1,62±3,52	3,23 ^a ±1,48
Média	90,67%±6,38	73,33±16,52	13,47±8,37	3,88±3,52	10,34±1,48

* Cada média ± desvio padrão representa os dados de três repetições com 100 embriões cada. Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si (Tukey, $\alpha=5\%$). Dados transformados por *arco seno* ($\sqrt{x/100}$).

4.3.2 Estádios embrionários submetidos ao resfriamento

O percentual de LT não diferiu estatisticamente ($p>0,05$) para os dois tempos de resfriamento utilizados (seis e 10 horas) (Tab. 2), porém apresentou número maior de LV no tempo de seis horas, no estágio de 8-hpf (Tab. 3).

Tabela 2. Larvas totais (LT) e subdivisão em larvas (vivas, LV; mortas, LM; não-eclodidas, LNE; ovos gorados, OG) de embriões de *P. mesopotamicus* submetidos à solução crioprotetora com metanol e sacarose, em dois tempos de estocagem a -8°C .

Estádios embrionários	LT	LV	LNE	LM	OG
6 horas	34,08±4,74	21,66±4,96 ^a	8,89±3,10	3,53±1,69	65,91±4,74
10 horas	22,14±4,74	8,75±4,96 ^b	9,34±3,10	4,31±1,69	77,58±4,74

* Cada média ± desvio padrão representa os dados de seis repetições com 100 embriões cada. Médias nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P<0,10$). Dados originais e análise estatística transformada por $\text{Arc Seno}(\text{raiz}(x/100))$.

Tabela 3. Larvas vivas (LV) de embriões de *P. mesopotamicus* nos diferentes estádios embrionários submetidos à solução crioprotetora com metanol e sacarose, estocados a -8°C por seis e 10 horas.

Estádios embrionários	Tempo de resfriamento	
	6 horas	10 horas
1,4-hpf	0,00 ^{Ca}	0,00 ^{Ba}
5,2-hpf	12,42±8,9 ^{Ba}	0,00 ^{Bb}
8-hpf	43,14±2,7 ^{Aa}	17,82±5,2 ^{Ab}
13,3-hpf	31,11±9,3 ^{Ba}	17,18±3,9 ^{Aa}

* Cada média ± desvio padrão representa os dados de seis repetições com 100 embriões cada. Mesma letra maiúscula para coluna e minúscula para linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P<0,10$). Dados originais e análise estatística transformada por $\text{Arc Seno}(\text{raiz}(x/100))$.

Os estádios de 13,3 e 8-hpf apresentaram médias de LT significativamente superiores ($p<0,05$) quando comparados aos estádios iniciais, como 1,4-hpf, onde foi verificada apenas a presença de OG. Porém, entre as médias que compõem LT, o maior percentual de LV foi no estágio de 8-hpf seguido pelo estágio de 13,3-hpf, sendo que neste último estágio a porcentagem de LM e LNE foi maior, de todo o modo não houve diferença do estágio de 8-hpf (Fig. 3).

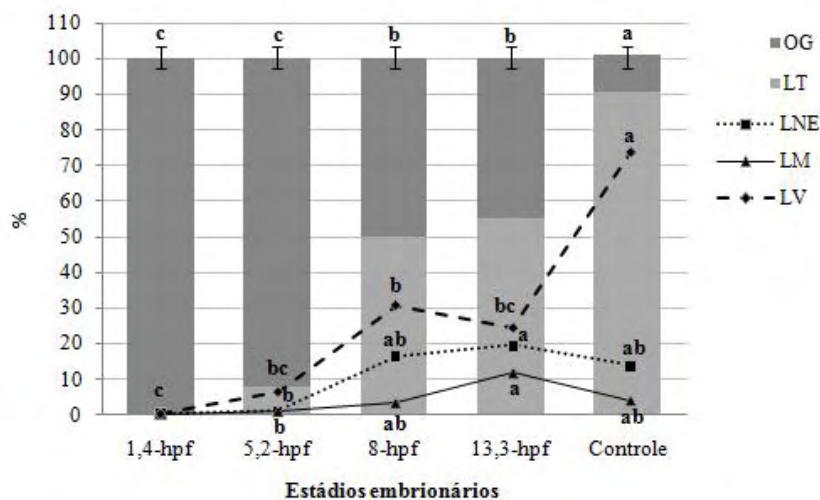


Fig. 3. Porcentuais de larvas totais (LT) e subdivisão em larvas (vivas, LV; mortas, LM; não-eclodidas, NE; ovos gorados, OG) para embriões de *P. mesopotamicus*, nos estádios embrionários de 1,4; 5,2; 8 e 13,3-hpf submetidos ao resfriamento por dois períodos. Cada média \pm desvio padrão representa os dados de seis repetições com 100 embriões cada. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si dentro da mesma variável, nos diferentes tratamentos (Tukey, $\alpha=5\%$). Dados transformados por *arco seno* ($\arcsin(x/100)$).

4.3.3 Análise morfológica dos embriões

O diâmetro do córion não diferiu estatisticamente ($p>0,05$), nos quatro estádios ontogenéticos utilizados, em seis e 10 horas de resfriamento, comparado ao controle. Pode-se verificar que nos estádios de 1,4; 8 e 13,3-hpf as medidas dos diâmetros do córion manifestaram-se de forma semelhante. Ou seja, o grupo controle apresentou inicialmente tendência de medidas maiores, sendo que, após seis horas, ocorreu redução desses diâmetros, que passaram a aumentar gradativamente até atingirem 10 horas de estocagem. Comportamento esse, que se apresentou de forma inversa para o estágio de 5,2-hpf, como pode ser visualizado na Fig. 4.

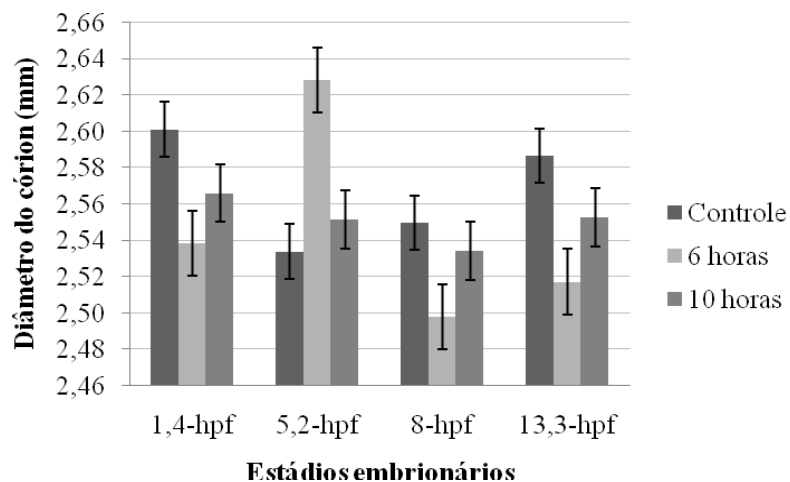


Fig. 4. Medidas de diâmetro do córion dos estádios embrionários *P. mesopotamicus* utilizados no resfriamento, no momento da coleta dos embriões de (controle), após seis e 10 horas de refrigeração. Não houve diferença estatística (Tukey, $\alpha=5\%$).

O diâmetro dos embriões tanto para o controle, quanto após seis e 10 horas de refrigeração foi similar (Fig. 5). No estágio de 1,4-hpf o diâmetro dos embriões com seis horas de refrigeração aumentou significativamente ($p<0,05$) em relação ao controle, reduzindo com 10 horas de estocagem a -8°C (Fig. 5). Enquanto, o estágio de 5,2-hpf não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) quando comparado o controle com o tratamento de seis horas de estocagem, sendo que, passadas 10 horas de refrigeração, esse valor diminuiu significativamente.

Não houveram diferenças significativas dos demais estádios embrionários (8 e 13,3-hpf) medidos quando comparados os tempos de estocagem e o controle. Para as medidas dos estádios embrionários dentro de cada tempo de resfriamento (controle, seis e 10 horas), os diâmetros dos embriões controle, nos estádios de 1,4; 5,2; 8 e 13,3-hpf, não diferiam entre si ($p>0,05$). Enquanto, nos embriões refrigerados por seis horas, o estágio de 8-hpf apresentou menor diâmetro e, refrigerados por 10 horas, o estágio de 1,4-hpf foi o maior diâmetro, em relação aos demais estádios embrionários, que permaneceram por ação do mesmo tempo de estocagem.

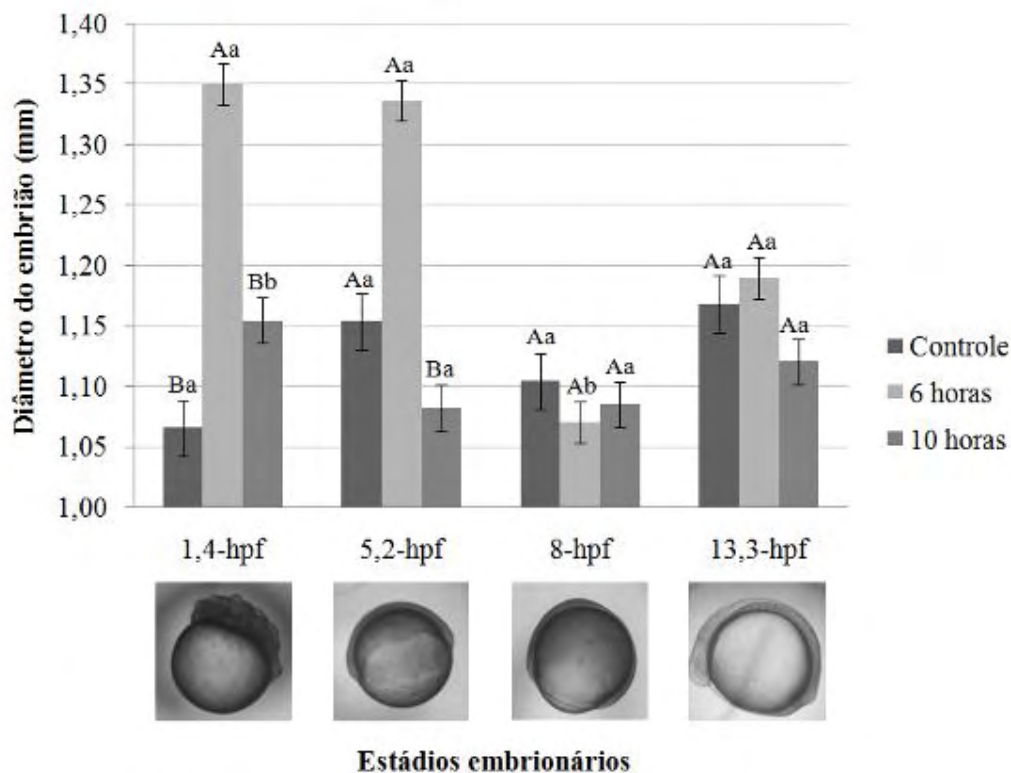


Fig. 5. Medidas de diâmetro do embrião dos estádios embrionários de *P. mesopotamicus* utilizados no resfriamento, no momento da coleta dos embriões (controle), após seis e 10 horas de refrigeração. Médias seguidas de mesma letra maiúscula para tempo de resfriamento dentro de cada estágio embrionário e, minúscula para estádios embrionários em cada tempo de resfriamento, não diferem entre si (Tukey, $\alpha=5\%$).

Houve correlação negativa entre LT e o diâmetro do embrião ($r = -0,37166$) ($p < 0,05$). Ou seja, quanto maior o diâmetro do embrião, menor o número total de larvas de *P. mesopotamicus*.

4.4 Discussão

Os embriões de cada estágio embrionário de *P. mesopotamicus* apresentaram diferenças no total de larvas mesmo sem passar por tratamento. Isto indica que ao selecionar ovos viáveis nos estádios mais iniciais (mórula- 1,4-hpf e 25% do movimento de epibolia- 5,2-hpf) a possibilidade de 100% desses se desenvolverem é menor que ao selecioná-los em estádios mais avançados. Sendo assim, para utilização como controle, deve-se considerar o efeito da taxa de eclosão para cada estágio embrionário, bem como, a qualidade dos ovos [17], que pode ser minimizado com a utilização de vários casais de reprodutores.

Para os parâmetros avaliados, a resposta dos embriões tratados de *P. mesopotamicus*, em dois tempos de estocagem não houve diferença significativa em relação ao número total de larvas, porém para a porcentagem de larvas vivas o estágio mais intermediário, 8-hpf apresentou melhor resultado, com seis horas de estocagem a -8°C , sendo que para o estágio de 13,3-hpf não apresentou diferença entre os tempos de estocagem, sugerindo que a resistência ao tempo de resfriamento pode aumentar quando utilizados estádios mais avançados.

Zhang et al. [24] afirmaram que durante o processo ontogenético podem ocorrer “falhas” que inviabilizam o sucesso da criopreservação, como ocorreu no estágio de 1,4-hpf, em que foi verificada apenas a presença de ovos gorados. Do mesmo modo Zhang e Rawson [8], trabalhando com embriões de *Danio rerio* em estádios iniciais também verificaram este fato. No presente estudo, pode-se atribuir isto ao fato de o *P. mesopotamicus* ser uma espécie tropical, fazendo com que haja sensibilidade mais elevada nestes estádios de desenvolvimento embrionário, devido à elevada quantidade de lipídios no embrião, dificultando a ação de proteção dos crioprotetores. Além disso, as fases iniciais de desenvolvimento embrionário são susceptíveis ao efeito tóxico sobre as células [25], ou seja, as vias metabólicas reguladoras nestes estádios ainda encontram-se pouco desenvolvidas sendo incapazes de compensar a toxicidade dos crioprotetores [17].

Embriões encontrando-se em uma fase mais complexa, outras dificuldades surgiram na utilização da técnica de resfriamento. Pois, no estágio mais avançado de 13,3-hpf, ocorreu maior incidência de larvas mortas e não eclodidas, em relação aos estádios iniciais, podendo essa ser uma tônica recorrente à medida que os embriões estejam mais desenvolvidos. O fato destes embriões terem morrido antes ou logo após a eclosão, reforça a idéia da sensibilidade das células embrionárias desta espécie a baixas temperaturas. Em geral, a sensibilidade ao frio está relacionada com o tipo, número e mecanismo de reparação das células e tecidos [26], ou seja, quanto maior a complexidade das células, menor a possibilidade dessas células reagirem da mesma forma quando expostas ao frio.

Os estádios embrionários mais resistentes para o *P. mesopotamicus*, tanto para as injúrias causadas pelo frio, quanto à toxicidade dos crioprotetores foram os intermediários, com 8 e 13,3-hpf. Resultados estes que corroboraram com os encontrados por Ahammad et al. [10], utilizando embriões de *Labeo rohita*, onde a maior sobrevivência dos embriões ocorreram também no estágio intermediário quando pode-se visualizar os batimentos cardíacos.

A sensibilidade ao resfriamento dependente do estágio, também está relacionada com a permeabilidade das paredes dos ovos e, ao mecanismo de bombeamento osmótico [22]. A permeabilidade em embriões de peixes é inferior quando comparada a embriões de *drosophilas* [27] e ratos [28]. Entretanto, os problemas causados pela osmorregulação são, na maioria, devido à quantidade de água retida nos embriões de peixes. Hagedorn et al. [22] por meio da técnica de microscopia eletrônica, mensuraram em embriões de *Danio rerio*, que do total do volume da água líquida, 61% encontra-se no vitelo, e o restante (39%) na blastoderme. Porém, esses valores podem variar de acordo com o estágio embrionário, espécie e o tempo em que esses embriões foram submetidos ao resfriamento. Sendo necessário, dessa forma, verificar alterações morfológicas, afim de constatar mudanças durante o resfriamento.

O diâmetro do embrião está diretamente relacionado com o volume do mesmo, uma vez que é alterado, indica que também houve alteração no volume. Lahnsteiner [17] utilizou o diâmetro como medidas morfométricas para avaliar a permeabilidade de embriões de *Danio rerio* em diferentes crioprotetores internos e externos. Ainda, Hagedorn et al. [23], utilizando o volume para mensurar a permeabilidade de crioprotetores na mesma espécie, constataram que durante o movimento de epibolia os embriões são relativamente esféricos, mudando após o movimento completo e, se houver mudança no volume (desidratação/hidratação), isto é causado pela permeabilidade da água e ou crioprotetores. O mesmo foi verificado no presente trabalho, até os embriões de *P. mesopotamicus* completarem o movimento de epibolia. Dessa forma, utilizou-se o diâmetro para mensurar a permeabilidade da solução crioprotetora nos diferentes estágios embrionários.

Foi verificado que para medidas de diâmetro do córion não houveram mudanças em relação ao controle em nenhum estágio embrionário, estocado por seis e 10 horas. Porém, as medidas dos diâmetros dos embriões variaram. Em 8-hpf (6 horas de resfriamento) foram encontradas as menores medidas de diâmetro dos embriões, sendo distintas em relação ao controle e 10 horas de resfriamento. Além disso, o maior diâmetro foi encontrado em 1,4-hpf em 10 horas de resfriamento. Ou seja, os estágios em que ocorreram a maior e menor taxa de sobrevivência (8 e 1,4-hpf, respectivamente) apresentaram diferentes permeabilidades, possivelmente, relacionado à saída de água e entrada de solução crioprotetora.

Cabe ressaltar que para cada estágio embrionário, o diâmetro dos embriões variou com o tempo de estocagem em relação ao controle nos dois estádios iniciais (1,4 e 5,2-hpf). Entretanto, nos estádios com maiores taxas de sobrevivência de embriões (8 e 13,3-hpf), estas variações não foram significativas. Sendo assim, a ação dos agentes crioprotetores está diretamente relacionada ao estágio embrionário e ao tempo de estocagem. Pois se a permeabilidade da água e crioprotetores não for adequada pode ocorrer formação de cristais de gelo, intra e extracelulares, considerados letais às células [29, 30]. Porém, os crioprotetores podem ser tóxicos a determinados estádios, provocando elevadas taxas de mortalidade [31]. Isto foi confirmado pelo coeficiente de correlação negativo, com embriões de *P. mesopotamicus*, entre as variáveis LT e diâmetro dos embriões, pois, o número total de larvas diminuiu conforme as medidas de diâmetro do embrião aumentaram.

Os estádios embrionários intermediários podem ser considerados os mais recomendados para a utilização em protocolo de resfriamento de embriões de *P. mesopotamicus*, mantidos até 10 horas a -8°C , sendo que o melhor resultado foi na utilização do estágio de 8-hpf estocado por seis horas. Entretanto, fatores relacionados a injúrias no resfriamento e, controle total da permeabilidade e osmorregulação do embrião devem ser considerados.

Agradecimentos

Este trabalho foi desenvolvido com apoio do CNPq, grupo de pesquisa PEIXEGEN/Universidade Estadual de Maringá e *Aquam*/Universidade Federal do Rio Grande do Sul, DUKE Energy Brasil, Faculdade de Agronomia Luiz Meneguel, e Laboratório de Histologia e Embriologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária /Universidade Estadual Paulista.

Referências bibliográficas

- [1] Serralheiro PC. Criopreservação de sêmen de peixes marinhos. Disponível no site: **Instituto de Pesca**, Jan/2008 (www.pesca.sp.gov.br).
- [2] Streit Jr DP, Ribeiro RP, Moraes GV, Mendes LDV, Digmayer M, Galo JM, Povh JA, Braccini Neto J. Sêmen de pacu (*Piaracatus mesopotamicus*) submetido ao

- resfriamento ao longo do tempo com diferentes meios diluidores. **Revista Biociências** 2008; 13: 178-87.
- [3] Murgas LDS, Miliorini AB, Freitas RTF, Pereira GJM. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores e crioprotetores. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia** 2007; 36: 526-31.
- [4] Ninhaus-Silveira A, Veríssimo-Silveira R, Senhorini JA, Alexandre JS, Chaguri MP. Fertilidade do sêmen de matrinxã, *Brycon amazonicus*, criopreservado em nitrogênio líquido. **Boletim Técnico do CEPTA** 2006; 19: 1-8.
- [5] Murgas LDS, Miliorini AB, Franciscatto RT, Maria AN. Viabilidade Espermática do Sêmen de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) Resfriado à 4°C. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia** 2004; 33: 1361-65.
- [6] Viveiros ATM, Maria AN. Semen cryopreservation of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), an endangered Brazilian species. In: **Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species**, Cabrita E, Robles V, Herráez MP. CRC Press - Taylor & Francis Group, LLC, 2008, pp. 361-6.
- [7] Gwo JC, Strawn K, Arnold CR. Change in mechanical tolerance and chilling sensitivity of red drum (*Sciaenopus ocellatus*) embryos during development. **Theriogenology** 1995; 43: 1155-61.
- [8] Zhang T, Rawson DM. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology** 1995; 32: 239-46.
- [9] Hagedorn M, Hsu E, Kleinhans FW, Wildt DE. New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation. **Cryobiology** 1997; 34: 335-47.
- [10] Ahammad MM, Bhattacharyya D, Jana BB. Stage-dependent hatching responses of rohu (*Labeo rohita*) embryos to different concentrations of cryoprotectants and temperatures. **Cryobiology** 2003; 46:1-16.
- [11] Maddock BG. A technique to prolong the incubation period of brown trout ova. **Progressive Fish Culturist** 1974; 36: 219-22.
- [12] Haga Y. On the subzero temperature preservation of fertilized eggs of rainbow trout. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries** 1982; 48: 1569-72.
- [13] Begovac PC, Wallace RC. Vitelline envelop proteins in the pipefish. **Journal of Morphology** 1986; 193:117-33.

- [14] Jaoul A, Roubaud P. Resistance de l'oeuf de carp commune (*Cyprinus carpio* L. Cyprinidae) a des chocs thermiques chauds ou froids. **Canadian Journal Zoology** 1982; 60: 3409-19.
- [15] Roubaud P, Chaillou C, Sjafei D. Variations cycliques de la toletance a un thermique froid appliqué au cours de la segmentation de lembryon de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.). **Canadian Journal of Zoology** 1985; 63: 657-63.
- [16] Liu K, Chou T, Lin H. Cryosurvival of goldfish embryos after subzero freezing. **Aquatic Living Resources** 1993; 6: 145-53.
- [17] Lahnsteiner F. The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology** 2008; 69: 384-96.
- [18] Calvi SL, Maisse G. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blastomeres: influence of embryo stage on postthaw survival rate. **Cryobiology** 1998; 36: 255-62.
- [19] Robles V, Cabrita E, De Paz P, Herráez MP. Studies on chorion hardening inhibition and dechorionization in turbot embryos. **Aquaculture** 2007; 262: 535.
- [20] Zar JH. **Biostatistical analysis**. Prentice Hall, 1999.
- [21] Tomita FI, Gonçalves LU, Araújo AH, Fornari DC, Viegas EM. Desenvolvimento embrionário de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: **Anais do Aquaciência 2008**. 2008.
- [22] Nakatani K, Agostinho AA, Baumgartner G, Bialezki A, Sanches PV, Makrakis MC, Pavanelli CS. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**, Maringá: EDUEM, 2001.
- [23] Hagedorn M, Kleinhans FW, Wildt DE, Rall WF. Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. **Cryobiology** 1997; 34: 251-63.
- [24] Zhang T, Liu X, Rawson DM. Effects of methanol and developmental arreston chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology** 2003; 59: 1545-56.
- [25] Bart A. New approaches in cryopreservation of fish embryos. In: **Cryopreservation in aquatic species**, Tiersch TR, Mazik PM. World Aquaculture Society, 2000, pp.179-87.

- [26] Dinnyes A, Urbanyi B, Baranyai B, Magyary I. Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants. **Theriogenology** 1998; 50: 1-13,.
- [27] Liu K, Pitt RE, Steponkus PL. Osmotic behavior of *Drosophila melanogaster* embryos. **Cryobiology** 1989; 26: 453-71.
- [28] Leibo SP. Image formation by induced local interactions: Examples employing nuclear magnetic resonance. **Nature** 1973; 242: 190-1.
- [29] Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. **Nature** 1949; 164: 666.
- [30] Leibo SP. Sources of variation in cryopreservation. In: **Cryopreservation in aquatic species**, Tiersch TR, Mazik PM. World Aquaculture Society 2000, pp.75-83.
- [31] Chao NH, Liao IC. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. **Aquaculture** 2001; 197: 161-89.

V. CURVAS DE RESFRIAMENTO PARA EMBRIÕES DE PACU, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887) ESTOCADOS A -8°C

Resumo

A técnica de resfriamento vem sendo utilizada como alternativa para observar os danos causados aos embriões quando expostos ao frio, como para espécies sul-americanas apenas o efeito tóxico dos crioprotetores vem sendo observado, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito das diferentes curvas de resfriamento lento na estocagem de embriões de pacu, *Piaractus mesopotamicus* submetidos ao resfriamento de -8°C. Embriões, no estágio de fechamento do blastóporo, foram divididos em dois grupos: G1- embriões submetidos à solução crioprotetora contendo metanol (10%) e sacarose (0,5M) que constituíram os seguintes tratamentos: (T1) direto da temperatura ambiente, levados ao refrigerador sem passar por curva; (T2) curva de resfriamento de 0,5°C/minuto e, (T3) curva de resfriamento de 1°C/minuto e; G2- somente a solução crioprotetora passou pelas mesmas curvas recebendo os embriões após diminuição da temperatura, compondo os tratamentos T4, T5 e T6, respectivamente. Os tratamentos foram mantidos a -8°C por um período de seis horas. O desenvolvimento dos embriões foi avaliado para cada tratamento, com seis repetições, em delineamento inteiramente casualizado. A sobrevivência dos embriões não submetidos à refrigeração foi de 94,3%±8,05. A porcentagem de larvas totais (LT) e ovos gorados (OG) não diferiram estatisticamente entre os grupos, com exceção para a porcentagem de LN, que apresentou melhor resultado no grupo G1, na curva de 1°C/minuto, ou seja, o momento em que os embriões foram submetidos à solução crioprotetora foi melhor antes da queda da temperatura. Além disso, quando comparada as três curvas de resfriamento, a diminuição de 1°C/minuto apresentou o maior percentual de LT (90,85%), seguida pela curva de 0,5°C/minuto (78,52%). Desta forma, recomenda-se a utilização de curvas de resfriamento de 1°C/minuto, para embriões de pacu estocados por seis horas, a -8°C, pois curvas com velocidade acima disso sofrem com injúrias causadas pela rápida queda da temperatura.

Palavras-chave: Biotecnologia, criopreservação, queda de temperatura, sobrevivência de larvas.

5.1 Introdução

A congelação de embriões de peixes ainda não é realizada com eficiência devido a uma série de fatores como: tamanho dos embriões; sistema complexo de compartimentos; permeabilidade entre as membranas e alta sensibilidade ao frio (Hagedorn et al., 1997; Hagedorn et al., 1998). Na busca por respostas, estudos têm utilizado a técnica de resfriamento (temperaturas próximas ao ponto de congelação da água) como alternativa para observar os danos causados aos embriões quando expostos ao frio (Ahammad et al., 1998; Liu et al., 2001; Zhang, et al., 2003; Ahammad, et. al, 2003). De forma geral, para que as células sejam mantidas em baixas temperaturas é essencial a utilização de agentes crioprotetores, pois, na sua ausência ocorre a formação de cristais de gelo, considerados letais para as células (Polge et al., 1949; Leibo, 2000). Por outro lado, apesar de necessário, a toxidez dos crioprotetores pode provocar a mortalidade das células durante a entrada ou saída no seu interior (Chao e Liao, 2001).

A desidratação das células durante o resfriamento depende diretamente da velocidade de redução da temperatura. Todavia, as curvas de resfriamento variam de acordo com os diferentes tipos de células, sendo necessário levar em consideração características como: quantidade de água intracelular; tamanho da célula; permeabilidade da membrana para a entrada e saída de água e; o coeficiente de temperatura (Hagedorn et al., 1997).

Há dois métodos de criopreservação utilizando-se curvas de resfriamento lento ou rápido. No primeiro as células são resfriadas com a diminuição gradativa da temperatura na presença de crioprotetores resultando em um aumento da osmolaridade do meio extracelular, o qual leva a rápida desidratação das células (Mazur, 1984). O segundo método é um processo de resfriamento rápido, conhecido como vitrificação, mas este requer uma rápida exposição das células a uma solução crioprotetora altamente concentrada, todavia torna-se mais tóxica (Fahy, 1984).

De acordo com Mazur (1977), ao submeter células contendo crioprotetores à temperatura ao redor de -5°C , tanto as células como o meio circundante provocam o abaixamento do ponto de solidificação da solução, efeito que é atribuído a presença da solução crioprotetora. Afirma também que quando a temperatura permanece entre -5 e -15°C , geralmente, ocorre a formação de gelo no meio extracelular, mas as células

continuam descongeladas e super resfriadas, provavelmente, porque a membrana plasmática impede o crescimento de cristais de gelo em direção ao meio extracelular.

Pesquisas relacionadas a técnicas de congelação e resfriamento de embriões desenvolvidas no Brasil são recentes (Ninhaus-Silveira et al., 2006; Streit Jr. et al., 2007), e estão relacionadas ao conhecimento do potencial tóxico dos crioprotetores nas espécies nativas. O *P. mesopotamicus* tem sido adotado como espécie sul-americana modelo (Streit, 2005; Streit et al., 2007; Neves, 2008; Fornari, 2009), onde foram observadas combinações de crioprotetores intra e extracelulares, para o resfriamento, a -8°C , e congelação. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes curvas de resfriamento na estocagem de embriões de *P. mesopotamicus*, a -8°C .

5.2 Material e métodos

5.2.1 Coleta de embriões

Para obtenção dos embriões foram utilizados seis casais de pacu, *P. mesopotamicus* da Estação de Hidrologia e Aquicultura da DUKE Energy Brasil, Salto Grande, São Paulo. Os reprodutores possuíam quatro anos de idade, e foram mantidos em tanques escavados, a uma densidade de $0,7 \text{ kg peixe/m}^2$. Os animais foram selecionados de acordo com o grau de maturação gonadal determinado pelas características externas (Teodoro & Ferraz de Lima, 1986; Gonçalves & Urbinati, 2005), para a indução à desova, onde a terapia hormonal utilizada foi de $5,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de extrato bruto de pituitária de carpa em duas doses ($0,5$ e $5,0 \text{ mg.Kg}^{-1}$), com intervalo de 12 horas para fêmeas, e $1,0 \text{ mg.Kg}^{-1}$ (dose única) para machos (via intramuscular). Após $275\text{h}^{\circ}\text{C}$ foi realizada a liberação dos gametas (extrusão) com posterior fertilização, para em seguida um pool de ovos serem levados para incubadoras de 7L, com fluxo de água contínuo e temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$.

5.2.2 Curvas de resfriamento

Foram selecionados ovos viáveis, ou seja, que apresentavam desenvolvimento embrionário normal, no estágio de fechamento do blastóporo (8 horas pós-fertilização), excluídos os ovos gorados (Fig. 1A e 1B). 1800 ovos formaram o primeiro grupo (G1), onde foram submetidos à solução crioprotetora, contendo metanol (10%) e sacarose (0,5M) para constituir os seguintes tratamentos: T1- Da temperatura ambiente levados direto ao

refrigerador, T2- Curva de 0,5°C/minuto e T3- Curva de 1°C/minuto. Após a queda da temperatura, estes foram levados a $-8\pm 2^{\circ}\text{C}$, por seis horas.

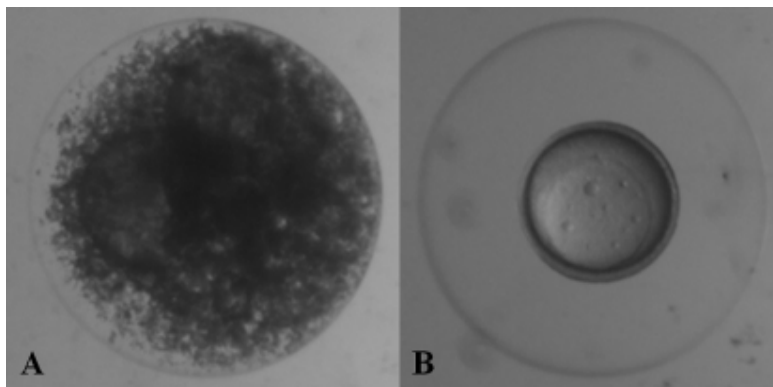


Fig. 1. A: Ovos gorados que foram descartados e, B: Ovos selecionados viáveis (embriões no estágio de fechamento do blastóporo) (estereomicroscópio, 40X).

O restante dos ovos (1800) formou o grupo dois (G2), aguardando o resfriamento da solução crioprotetora, que passou pelos tratamentos: T4- Direto da temperatura ambiente ao refrigerador, T5- Curva de 0,5°C/minuto e T6- Curva de 1°C/minuto, onde a temperatura diminuiu gradativamente, até chegar a -5°C , para, em seguida receber os ovos que então foram encaminhados ao refrigerador (-8°C), durante seis horas (Fig. 2). Ovos selecionados viáveis sem passar pelo resfriamento foram utilizados para estimar as taxas de eclosão.

Para controlar a queda da temperatura durante as curvas de resfriamento foram utilizadas seis caixas de isopor e gelo. Cada caixa foi mantida a uma temperatura constante (20, 15, 10, 5, 0 e -5°C , respectivamente), monitorada com o auxílio de termômetros, para que os embriões fossem transferidos conforme tempo proposto em cada curva (Fig. 2).

Completado o período de estocagem, cada repetição, composta por 100 embriões, foi retirada do refrigerador e transferida a uma incubadora de 3L (fluxo de água contínuo), onde permaneceram até a eclosão, cerca de 18 horas pós-fertilização.

5.2.3 Viabilidade dos embriões

O desenvolvimento dos embriões, após o processo de resfriamento, foi avaliado após a eclosão, através da estimativa das larvas totais (LT), que se subdividiu em larvas: natantes (LN), mortas (LM), não eclodidas (LNE) e ainda, a presença de ovos gorados (OG), em cada unidade experimental.

5.2.4 Análise estatística

Os dados foram avaliados usando delineamento inteiramente casualizado, onde cada tratamento foi repetido seis vezes. Para a comparação das médias foi empregada a ANOVA e o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

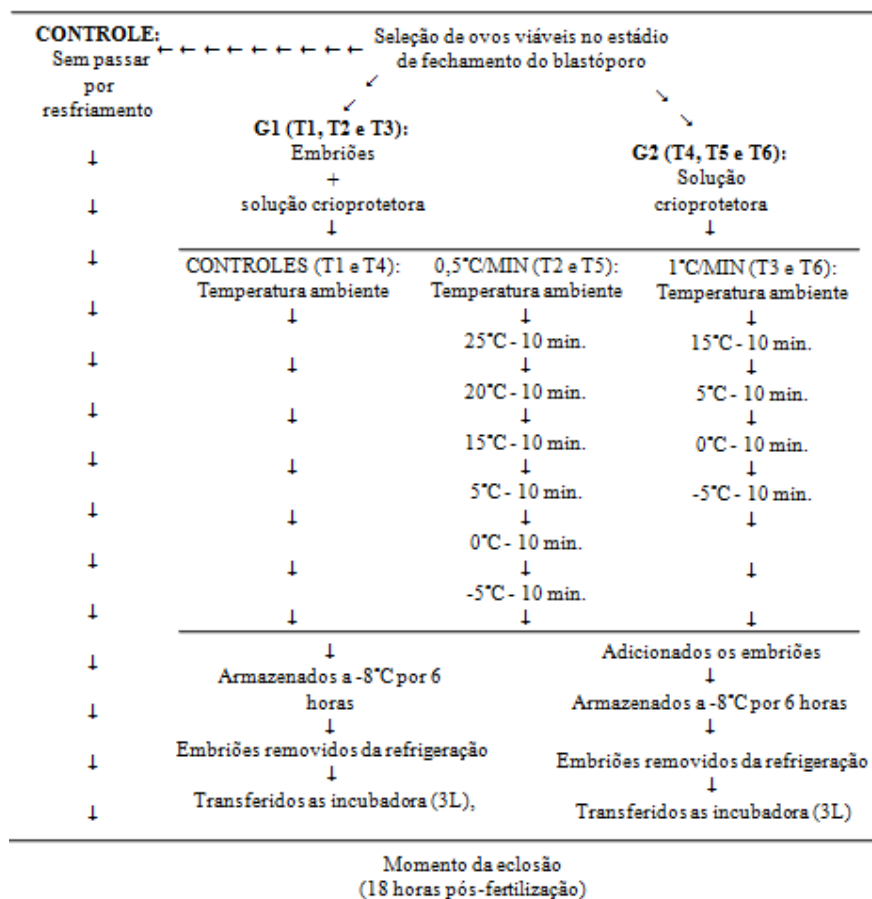


Fig. 2. Fluxograma de resfriamento de embriões de *P. mesopotamicus* sendo os embriões em solução crioprotetora (G1) submetidos a diferentes curvas de resfriamento e a solução crioprotetora (G2) passando pelas diferentes curvas, recebendo os embriões após queda da temperatura.

5.3 Resultados

O número total de larvas eclodidas dos embriões que não passaram pelo resfriamento foi estimada em $94,3\% \pm 8,05$. Quando comparadas as médias dos embriões que passaram por resfriamento, G1 e G2, não mostraram diferenças estatísticas entre os embriões que passaram por queda de temperatura em meio à solução crioprotetora, daqueles embriões que foram adicionados a solução após a queda de temperatura ($p > 0,05$) (Tab. 1).

Tab. 1. Porcentagem de larvas totais (LT): natantes (LN), mortas (LM) e, não eclodidas (LNE); e ovos gorados (OG) para os dois grupos: G1-embriões em solução crioprotetora e G2-solução crioprotetora e posterior recebimento dos embriões de *P. mesopotamicus* que foram estocados a -8°C por seis horas.

Curvas de resfriamento	LT	LN	LM	LNE	OG
G1	82,81	51,13	11,29	20,36	17,19
G2	74,55	48,72	11,51	14,31	25,45
D.P.	10,67	14,01	8,39	11,30	10,71

* Médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Dados originais e análise estatística transformada por *Arc Seno(raiz(x/100))*.

Em relação à porcentagem de LN, não houve diferença comparando as médias dos grupos (Tab. 1), porém comparando os tratamentos T3 e T6 os resultados diferem, ou seja, ambos os tratamentos que passaram por curva de resfriamento de $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, apresentaram diferença significativa, sendo que o T3 foi superior estatisticamente ao T6. Os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Tab. 2).

Tab. 2. Porcentagem de LN (larvas natantes) de embriões de *P. mesopotamicus* que foram estocados a -8°C por seis horas, em diferentes formas de submissão a solução crioprotetora (G1-embriões em solução crioprotetora e G2-solução crioprotetora e posterior recebimento dos embriões).

Curvas de resfriamento	Formas de submissão	
	G1	G2
Direto (T1 e T4)	40,89 ^{Ba}	52,56 ^{Aa}
0,5 $^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ (T2 e T5)	41,05 ^{Ba}	54,95 ^{Aa}
1 $^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ (T3 e T6)	71,45 ^{Aa}	41,05 ^{Bb}
D.P.	8,2	20,2

* Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Dados originais e análise estatística transformada por *Arc Seno(raiz(x/100))*.

O efeito das curvas dentro de cada grupo, G1 (Fig. 3) e G2 (Fig. 4), para o número total de larvas foi significativamente diferente de acordo com a velocidade de queda da temperatura ($p < 0,05$). Nos embriões submetidos ao grupo G1, o percentual de LT nas curvas de 0,5 e $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ foi estatisticamente superior ($p < 0,05$) comparada aos que passaram da temperatura ambiente direto para a temperatura de estocagem (-8°C). Porém, a $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ houve maior porcentagem de LN, sendo que para LM e LNE não diferiram estatisticamente das demais curvas ($p > 0,05$) (Fig. 3).

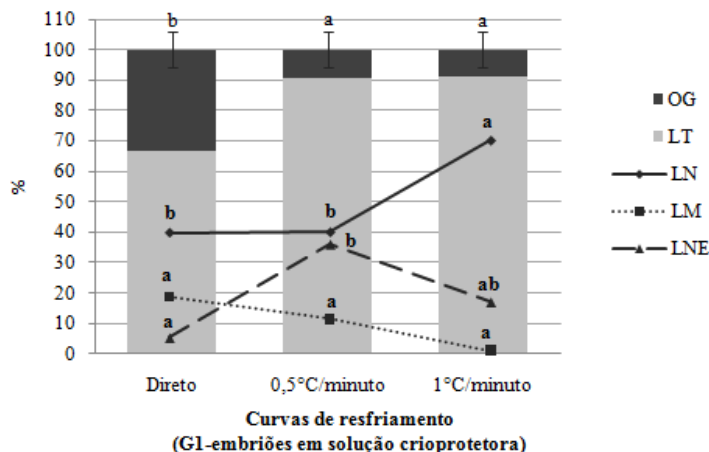


Fig. 3. Efeito das curvas de resfriamento no grupo G1 em relação ao total de larvas (LT); larvas natantes (LN); larvas mortas (LM); larvas não eclodidas (LNE) e; ovos gorados (OG) de *P. mesopotamicus* estocados a -8°C por seis horas. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P<0,05$). Dados originais e análise estatística transformada por $\text{Arc Seno}(\text{raiz}(x/100))$.

Para o resfriamento da solução crioprotetora, cujos embriões foram adicionados após redução da temperatura (G2), apesar da curva de $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ apresentar porcentagem de LT superior as demais curvas ($p<0,05$), a quantidade de LN foi menor ($p<0,05$) e, em contrapartida, o percentual de LNE foi significativamente maior (Fig. 4).

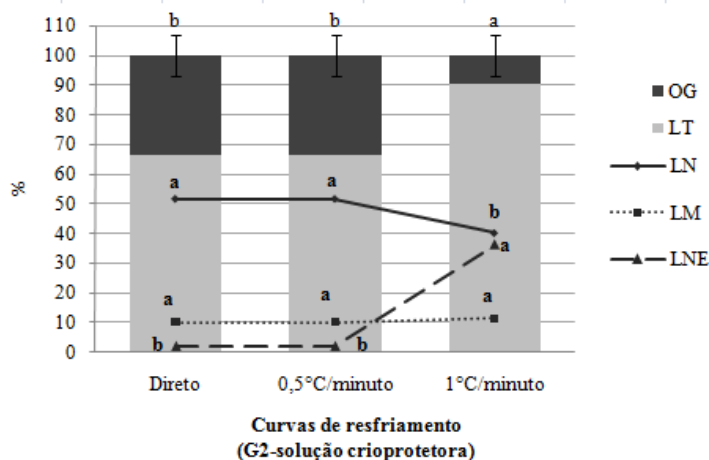


Fig. 4. Efeito das curvas de resfriamento no grupo G2 em relação ao total de larvas (LT); larvas natantes (LN); larvas mortas (LM); larvas não eclodidas (LNE) e; ovos gorados (OG) de *P. mesopotamicus* estocados a -8°C por seis horas. Médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P<0,05$). Dados originais e análise estatística transformada por $\text{Arc Seno}(\text{raiz}(x/100))$.

Quando comparada as médias das curvas de resfriamento pode-se observar que a curva de $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ apresentou porcentual de LT maior do que os embriões que estavam à temperatura ambiente e foram diretamente alocados na temperatura de -8°C ($p<0,05$), no entanto estas duas não diferiram da curva de $0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ ($p>0,05$) (Fig. 5). Esta mesma

condição pode ser observada para LNE e OG ($p < 0,05$), porém, a porcentagem de LN e LM não diferiram entre si ($p > 0,05$) (Tab. 3).

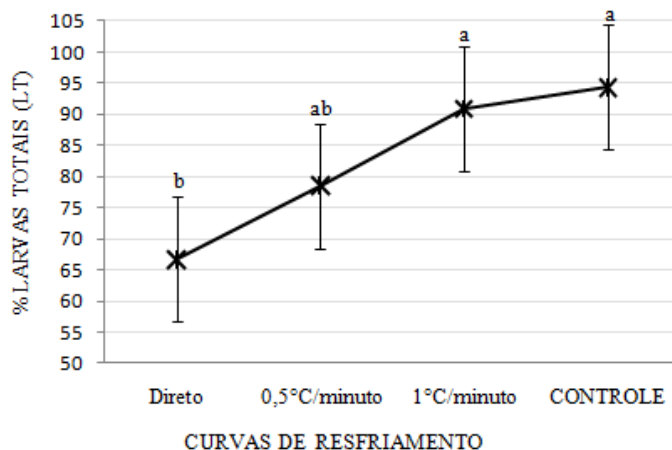


Fig. 5. Porcentual de larvas totais entre as curvas de resfriamento para ambos os grupos (G1-embriões em solução crioprotetora e G2-solução crioprotetora) observados em embriões de *P. mesopotamicus* estocados por seis horas, a -8°C . Médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). Dados originais e análise estatística transformada por $\text{Arc Seno}(\text{raiz}(x/100))$.

Tab. 3. Comparação entre as curvas de resfriamento na porcentagem de larvas: natantes (LN), mortas (LM) e, não eclodidas (LNE); e ovos gorados (OG) de *P. mesopotamicus* estocados a -8°C por seis horas.

Curvas de resfriamento	LN	LM	LNE	OG
Direto	46,73	15,4	4,52 ^b	33,32 ^b
0,5°C/minuto	46,81	11,72	19,99 ^a	21,48 ^{ab}
1°C/minuto	56,25	7,06	27,5 ^a	9,6 ^a
D.P.	20,71	12,4	16,71	12,83

* Médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). Dados originais e análise estatística transformada por $\text{Arc Seno}(\text{raiz}(x/100))$.

5.4 Discussão

A utilização de protocolos de resfriamento tem como objetivo a remoção total da água intracelular por meio de um processo de queda gradativa da temperatura, para que assim não ocorra formação de cristais de gelo, que são letais as células (Hagedorn et al., 2004). Os autores mostram que a temperatura de formação de gelo extracelular depende da solução crioprotetora utilizada, mas que em geral, é entre -5 a -15°C , sendo que a presença ou não dos embriões na solução não alteraram a temperatura do meio no momento de

formação de gelo. O presente estudo indica que não foram detectadas diferenças estatísticas no momento em que os embriões foram submetidos à solução crioprotetora. Ou seja, a desidratação das células ocorreu de forma semelhante, quando os embriões passaram por diminuição gradativa de temperatura na presença da solução, ou quando foram submetidos diretamente em solução na temperatura de -8°C .

As observações de Morris e Watson (1984) para formação de injúrias corroboram com os resultados encontrados para embriões de *P. mesopotamicus*. Estes autores citam que as injúrias causadas pela submissão de células ao resfriamento são classificadas em duas categorias: (a) direta, onde ocorre o choque térmico em consequência ao rápido resfriamento e; (b) indireta, que é independente da curva de resfriamento, e se manifesta depois de longo período de estocagem em baixas temperaturas. Sendo assim, a quantidade de LT, para os dois grupos utilizados, foi menor quando houve resfriamento sem passar por curva, ou seja, essa forma de resfriamento causou uma injúria direta, o que pode ser atribuído ao choque térmico sofrido pelas células.

De forma geral, a maior porcentagem de LT foi encontrada quando os embriões foram submetidos à curva de resfriamento a $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, o que indica que no resfriamento lento, acima dessa velocidade, diminui a viabilidade dos embriões. Em estádios distintos, embriões de *Danio rerio*, estudados por Lahnsteiner (2009), não mostraram diferenças entre a curva de resfriamento lento ($0,35^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$) e o resfriamento direto, no término do desenvolvimento embrionário. Os resultados entre as pesquisas mostraram que essas diferenças talvez estejam relacionadas aos crioprotetores utilizados (PPS-physiologic saline solution (125mmol/L NaCl, 2mmol/L KCl, 1mmol/L CaCl_2 , 1mmol/L MgSO_4 , 100mmol/L tris)). Pois, Zang et. al (2003), usando metanol em três curvas de resfriamento (1, 30 e $300^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$) em diferentes estádios embrionários de *Danio rerio*, mostrou altas taxas de sobrevivência dos embriões nas três curvas em qualquer estágio estudado.

Quanto à forma de submissão dos embriões a solução crioprotetora, observou-se que em embriões submetidos inicialmente a solução crioprotetora, as curvas de 0,5 e $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ apresentaram melhor incidência de LT, porém, as LN ocorreram em maior número na curva de $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, o que está diretamente relacionado com a velocidade de formação de gelo. Enquanto, para embriões expostos a solução crioprotetora no fim da curva de resfriamento (-8°C), pode-se verificar um menor número de LN na curva de $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, apesar de essa ter apresentado maior porcentagem de LT. Para Mazur (1980) a resistência de tecidos vivos a baixas temperaturas depende da velocidade do resfriamento,

bem como do efeito tóxico do crioprotetor a ser submetido, sendo assim, essas diferenças de LT e LN podem estar relacionadas aos efeitos da solução crioprotetora sob os embriões em diferentes situações de resfriamento.

A origem das injúrias provocadas pelo resfriamento, direto ou indireto, está relacionada com: a fase de transição da membrana lipídica, a despolimerização dos microtúbulos, a dificuldade da divisão celular e, a desnaturação das proteínas (Liu et al., 2001; Zhang et al., 2003). Apesar de não deixarem claro o mecanismo de proteção do metanol aos embriões de *Danio rerio*, Zhang et al. (2003) atribuíram seu efeito as características comuns a cadeias curtas de álcool, que são capazes de diminuir a temperatura da fase de transição da membrana lipídica.

Em conclusão, os embriões que foram submetidos da temperatura ambiente a solução crioprotetora com metanol e sacarose, com velocidade de resfriamento de 1 °C/minuto, para serem estocados a -8°C, produziu um percentual maior de embriões viáveis. Sendo que, a submissão dos embriões na solução crioprotetora antes de passar por curva de resfriamento apresentou uma quantidade maior de larvas natantes.

Agradecimentos

Este trabalho foi desenvolvido com apoio do CNPq, grupo de pesquisa PEIXEGEN/Universidade Estadual de Maringá e *Aquam*/Universidade Federal do Rio Grande do Sul, DUKE Energy Brasil, e Faculdade de Agronomia Luiz Meneguel.

Referências Bibliográficas

- AHAMMAD, M. M.; BHATTACHAYYA, D.; JANA, B. B. Effect of different concentrations of cryoprotectant and extender on the hatching of Indian major carp embryos (*Labeo rohita*, *Catla catla*, and *Cirrhinus mrigala*) stored at low temperature. **Cryobiology**, v.37, p.318-324, 1998.
- AHAMMAD, M.M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B.B. Stage-dependent hatching responses of rohu (*Labeo rohita*) embryos to different concentrations of cryoprotectants and temperatures. **Cryobiology**, v.46, p.1-16, 2003.
- CHAO, N. H.; LIAO, I. C. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. **Aquaculture**, v.197, p.161-189, 2001.
- FAHY, G. M.; MAC FARLANE, D. R.; ANGELL, C. A.; MERYMAN, H. T. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v.21, p.407-426, 1984.

- FORNARI, D. C. **Crioprotetores no resfriamento e congelamento de embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Zootecnia), Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2009, 64p.
- GONÇALVES, F. D.; URBINATI, E. C. Growth and metabolic stores of pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1987), as affected by fasting and type of diet. **Scientia Agricola**, 2005.
- HAGEDORN, M.; HSU, E.; KLEINHANS, F. W.; WILDT, D. E. New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation. **Cryobiology**, v.34 p.335-347, 1997.
- HAGEDORN, M.; KLEINHANS, F. W.; ARTEMOV, D.; PILATUS, U. Characterization of a major Permeability Barrier in the Zebrafish Embryo. **Biology of Reproduction**, v.59, p.1240-1250, 1998.
- 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, p.181-189, 2004.
- LAHNSTEINER, F. Factors affecting storage of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, v.72, p. 333-340, 2009.
- LEIBO, S. P. Sources of variation in cryopreservation. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. **Cryopreservation in aquatic species**, Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000, p.75-83.
- LIU, X.H.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Effect of cooling rate and partial removal of yolk on the chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, v.55, p.1719-1731, 2001.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: Mechanisms and implications. **Cellular Physiology**, v.16, p.C125-C142, 1984.
- MAZUR, P. The role intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology**, San Dieg, v.14, p.251-272, 1977.
- MAZUR, P. Limits to life at low temperatures and at reduced water contents and water activities. **Origins of Life**. v.10, p.137-159, 1980.
- MORRIS, G. J.; WATSON, P. F. Cold shock injury-a comprehensive bibliography. **Cryo-Letters**, v.5, p.352-372, 1984.
- NEVES, P. R. **Utilização de crioprotetores intra e extracelulares em embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. Tese de Doutorado (Doutorado em Zootecnia), Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2008, 71p.
- NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes, Prochilodontidae). **Zygote**, v.14, p.217-229, 2006.

- POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. **Nature**, v.164, p.666, 1949.
- STREIT JR, D. P. **Crioprotetores e resfriamento de embriões de pacu (*P. mesopotamicus*)**. Tese de Doutorado (Doutorado em Zootecnia), Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2005.
- STREIT, D. P.; DIGMAYER, M.; RIBEIRO, R. P.; SIROL, R. N.; MORAES, G. V. e GALO, J. M. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1119-1202, 2007.
- TEODORO, A. J.; FERRAZ DE LIMA, J. A. Observações práticas sobre a reprodução induzida de pacu, *Colossoma mitrei* (liberação espontânea de óvulos). In: **Simpósio Brasileiro de Aquicultura**, n.4, p.99-112, 1986.
- ZHANG, T.; LIU, X.; RAWSON, D. M. Effects of methanol and developmental arrest on chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, v.59, p.1545-1556, 2003.

VI. ANEXOS



Reprodutor de pacu (*P. mesopotamicus*).



Fertilização dos ovócitos.



Embrões sendo submetidos à solução crioprotetora.



Embrões em solução crioprotetora passando pela temperatura de 5°C para completar a curva de resfriamento de 1°C/minuto.



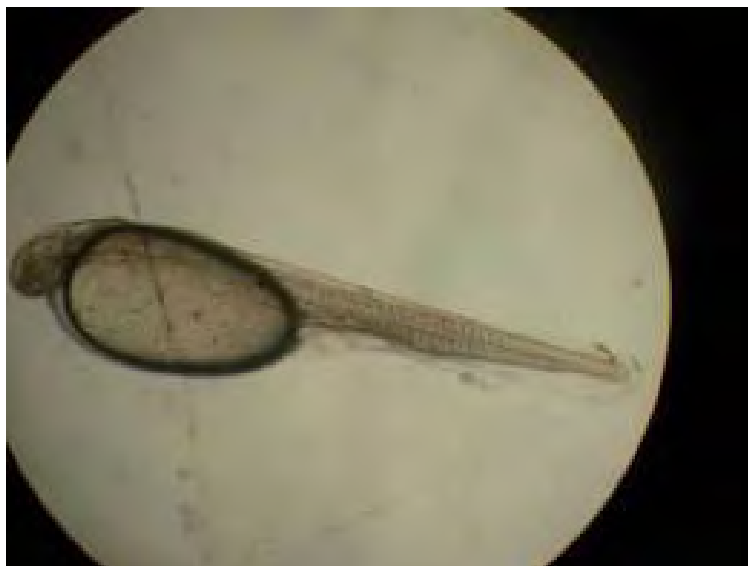
Caixas de isopor utilizadas para realizar a diminuição gradativa da temperatura (curva de resfriamento).



Incubadoras de 3L onde os embriões, estocados a -8°C , foram aclimatados para completarem o desenvolvimento embrionário.



Estrutura para incubadoras de 3L, onde foram distribuídos os tratamentos.



Larva normal (natante) de pacu, recém eclodida.