



CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Crioconservação de Embriões de Peixes Neotropicais

Raphael da Silva Costa

MESTRADO



PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL

Biologia
Estrutural

Raphael da Silva Costa

Crioconservação de Embriões de Peixes Neotropicais

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Área de Concentração – Biologia Animal, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Ninhaus
Silveira

São José do Rio Preto
2013

Costa, Raphael da Silva
Crioconservação de Embriões de Peixes Neotropicais/
Raphael da Silva Costa. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2013.
155 f.:38 il. ; 30 cm.

Orientador: Alexandre Ninhaus Silveira
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto
de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Curimbatá. 2. Peixes. 3. Crioconservação. I. Silveira,
Alexandre Ninhaus. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto
de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 597

Raphael da Silva Costa

Crioconservação de Embriões de Peixes Neotropicais

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Área de Concentração – Biologia animal, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Alexandre Ninhaus Silveira
UNESP – Ilha Solteira
Orientador

Dr. George Shigueki Yasui
USP – Pirassununga

Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Junior
UFRS – Porto Alegre

São José do Rio Preto
05 de fevereiro de 2013

DEDICO

A meus pais Carlos Roberto Costa e Elidia Maria da S. Costa, que tanto amo e que foram, são e sempre serão a base para realização de todos os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A espiritualidade.

A meus pais Carlos Roberto Costa e Elidia Maria da Silva Costa por todo amor, ajuda, confiança e paciência; sem eles nenhum dos meus sonhos teriam se tornado realidade.

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

A Anay Gamero Costa, minha amada esposa e companheira, a Pedro Gamero R. Marinho e Vitor Gamero R. Marinho, por todo amor, paciência e auxílio nas horas de ausência e dificuldades.

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

Agradeço a Rogério Barbosa, Debora, Neiva e Mário Gamero, família amorosa e honrada a qual hoje me faço presente.

Ao meu orientador Alexandre Ninhaus Silveira por todo conhecimento, amizade, compressão, paciência, paciência e mais paciência ao longo dessa etapa de minha formação; e à Professora Dra. Rosicleire Verissimo Silveira, minha primeira orientadora, que primeiramente me ensinou o significado de ser um bom pesquisador. Parceiros que juntos, sempre nos ensinaram que podemos ir além do que inicialmente acreditávamos e que tudo sempre pode ser melhorado, dependendo apenas de “horas acento e suor no rosto”.

Ao grupo de pesquisa e amigos do Laboratório de ictiologia Neotropical (LINeo), por todas as dificuldades enfrentadas, apoios e crescimento pessoal e profissional.

Agradeço ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais - CEPTA/ICMBIO por todo apoio no decorrer dos experimentos, em especial ao Dr. José Augusto Senhorini pela grande ajuda e amizade.

Aos membros da comissão examinadora, de qualificação e defesa, que aceitaram o convite (Dr. Sérgio Luís Carvalho, Dra. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni, Dr. George Shigueki Yasui, Dr. Danilo Pedro Streit Junior, Dr. José Augusto Senhorini e Dra. Lilian Casatti)

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

Ao CNPq pela bolsa concedida.

**“Algo só é impossível até que
alguém duvide e prove o
contrário.”**

Albert Einstein

RESUMO

A criopreservação é uma ferramenta biotecnológica que permite congelar e estocar, por longos períodos células, tecidos, órgãos e embriões; contudo, o sucesso desta tecnologia, para peixes, é bem estabelecida apenas para as células germinativas masculinas, conservando assim, parcialmente material genético de uma população. Desta forma objetivou-se estabelecer um eficaz protocolo de crioconservação para embriões de peixes neotropicais, visando à preservação total da bagagem genética da espécie. Utilizou-se como modelo biológico embriões de *Prochilodus lineatus*, que foram avaliados quanto a sua sensibilidade ao frio, à toxicidade dos crioprotetores dimetil formamida, dimetil sulfóxido, propileno glicol e glicerol, aos protocolos de resfriamento nos estágios de gastrulação e organogênese com seis e vinte somitos e a vitrificação nos estágios de organogênese com seis e vinte somitos. As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2% em tampão fosfato Sorensen 0,2 M pH 7,2, incluídos em metacrilato glicol, seccionados a 3 e 5 µm de espessura e corados com hematoxilina-eosina, azul de toluidína, P.A.S. e metanil yellow. A fase embrionária de organogênese com 20 somitos foi a mais resistente ao frio e a toxicidade dos crioprotetores. Apesar das altas taxas de larvas vivas nos tratamento de resfriamento, em nenhum dos protocolos propostos obteve-se êxito na preservação das estruturas embrionárias, sendo verificado graves danos morfológicos como corpo reduzido e com sinuosidades, nadadeiras com crescimento desordenado das células, alta concentração de células necróticas na região do encéfalo, má-formação das vesículas ópticas e óticas, má-formação das narinas, fusão desordenada dos mioblastos, retração do vitelo, espaços entre as células provocadas pela formação de cristais de gelo, glóbulos de vitelo com consistência alterada, periblasto elétron-denso e com núcleos apresentando cromatina alterada ou destruída; contudo, estruturas como somitos, tubo neural, endoderme e a ectoderme apresentaram núcleos e mitocôndrias íntegras. O protocolo de vitrificação resultou em palhetas transparentes, indicando o sucesso da etapa, contudo, durante o descongelamento, os embriões sofreram um aumento em seu volume e conseqüente deterioração de

suas estruturas devido à nucleação interna dos cristais de gelo, que rompiam coesão tecidual e promoviam a perda das características das fases embrionárias. Assim concluiu-se que o uso das soluções crioprotetoras junto à exposição dos embriões às baixas temperaturas é extremamente deletério ao seu desenvolvimento, necessitando de maiores estudos para compreender seus reais efeitos sobre o organismo.

Palavras-chave: Curimatá. Criopreservação. Gelo. Nucleação. Toxicidade.

ABSTRACT

Cryopreservation is a biotechnological tool that allows you to freeze and store cells, tissues, organs and embryos for long periods; however, the success of this technology, to the fish, it is established only from the male germ cells, preserving, partly the material of a population. Therefore the purpose was to establish an effective protocol of cryopreservation to embryos of neotropical fish, in order to preserv all the genetic load of the species. As biological model of this research it was used Prochilodus lineatus type of embryos, which were evaluated regarding to their sensibility to cold temperatures, the toxicity of cryoprotectants dimethyl formamide, dimethyl sulfoxide, propylene glycol and glycerol, also the protocols of cooling down on the gastrulation and organogenesis stages with six and twenty somites, and the vitrification on the organogenesis stages with six and twenty somites. The samples were fixed in solutions with 4% of paraformaldehyde and 2% of glutaraldehyde, Sorensen phosphate with 0.2 M pH 7.2, included in glycol methacrylate, sectioned at 3 and 5 μm of thickness and stained with hematoxylin-eosin, Blue toluidine, PAS and Metanil Yellow. The embryonic phase of organogenesis with 20 somites was the most resistant to cold and toxicity of cryoprotectants. Despite of the high rates of alived larvae founded in the cooling treatment, none of the proposed protocols succeded in the preservation of the embryonic structures, it could be seen severe morphological damages as reduction in the body and sinuous in the forms, with fins disorderly cell growth, high concentration of necrotic cells on region of the brain, malformation of the ear and eyes vesicle, malformation of the nostrils, disorderly fusion of the myoblasts, retraction of the yolk, spaces between cells caused by the formation of ice crystals, yolk globules with altered consistency, periblasto electron-dense and with nuclei presenting altered or destroyed chromatin; nonetheless, some structures such as neural tube, somites, ectoderm and the endoderm presented intact nuclei and mitochondria. The vitrification protocol resulted in transparent straws, showing the success of the step, however, along the thawing, the embryos had the volume increased and therefore the deterioration of its inner structure due to nucleation of ice crystals, which was breaking the tissue and provoking the loss of the embryonic phases' characteristics. Thereby it was concluded that the use of cryoprotectant solutions together with the embryos exposure to low temperatures is extremely detrimental to their development, requiring further studies to understand the real effect on the organism.

Keywords: Curimbatá, cryopreservation, ice crystals, nucleation and toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Compartimentos embrionários	29
Figura 2 -	Atuação dos crioprotetores em embriões de peixes.	32
Figura 3 -	Organograma da extração da membrana coriônica.....	49
Figura 4 -	Organograma do teste de Sensibilidade ao Frio.....	50
Figura 5 -	Organograma do teste de toxicidade.....	51
Figura 6 -	Organograma do teste de resfriamento de embriões.	53
Figura 7 -	Gráfico das médias de larvas eclodidas em relação aos tratamentos de retirada da membrana coriônica.	54
Figura 8 -	Médias de larvas eclodidas expostas ao frio.	55
Figura 9 -	Médias de larvas eclodidas em relação aos tratamentos de sensibilidade ao frio por fase de desenvolvimento embrionário.....	56
Figura 10 -	Médias de larvas eclodidas em relação aos tratamentos de toxicidade por fase de desenvolvimento embrionário.	57
Figura 11 -	Gráfico das médias de larvas eclodidas relacionado aos diferentes crioprotetores	58
Figura 12 -	Médias de larvas eclodidas em relação aos tratamentos de toxicidade.....	59
Figura 13 -	Médias de larvas eclodidas em relação aos tratamentos de Resfriamento.....	61
Figura 14 -	Larvas inviáveis com relação ao percentual de larvas vivas dos tratamentos de resfriamento.....	62
Figura 15 -	Morfologia externa das larvas de <i>Prochilodus lineatus</i>	63
Figura 16 -	Morfologia das larvas de <i>Prochilodus lineatus</i>	64
Figura 17 -	Morfologia das larvas de <i>Prochilodus lineatus</i>	66
Figura 18 -	Morfologia das larvas de <i>Prochilodus lineatus</i>	68
Figura 19 -	Morfologia das larvas de <i>Prochilodus lineatus</i>	70

Figura 20 - Morfologia das larvas de <i>Prochilodus lineatus</i>	72
Figura 21 - Morfologia das larvas de <i>Prochilodus lineatus</i>	74
Figura 22 - Morfologia externa das larvas de <i>Prochilodus lineatus</i>	78
Figura 23 - Morfologia das larvas de <i>Prochilodus lineatus</i>	80
Figura 24 - Morfologia das larvas de <i>Prochilodus lineatus</i>	82
Figura 25 - Morfologia das larvas de <i>Prochilodus lineatus</i>	84
Figura 26 - Morfologia das larvas de <i>Prochilodus lineatus</i>	86
Figura 27 - Microscopia eletrônica de transmissão em embriões criopreservados de <i>Prochilodus lineatus</i>	88
Figura 28 - Morfologia dos embriões resfriados de <i>Prochilodus lineatus</i>	90
Figura 29 - Características avaliadas nas palhetas expostas ao nitrogênio líquido; formação de cristais de gelo e forma vítrea.	115
Figura 30 - Organograma do processo de vitrificação de embriões com seis e vinte somitos.	116
Figura 31 - Morfologia dos embriões criopreservados de <i>Prochilodus lineatus</i>	119
Figura 32 - Reprodução do <i>Prochilodus lineatus</i>	132
Figura 33 - Embriões de <i>Prochilodus lineatus</i>	133
Figura 34 - Padrão de uma amostra (139 ± 11 embriões)	134
Figura 35 - Incubadoras-PVC	135
Figura 36 - Etapas do teste de toxicidade	136
Figura 37 - Acondicionamento dos embriões em tanques de nitrogênio.....	137
Figura 38 - Etapa de envase dos embriões em palhetas criogênicas e imersão em nitrogênio líquido	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Danos gerados às estruturas celulares pelos tratamentos de crioconservação	110
Tabela 2 - Teste de soluções vitrificantes.....	114
Tabela 3 - Resultados dos testes de vitrificação das soluções crioprotetoras	117

SUMÁRIO

1	CRIOCONSERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE PEIXES NEOTROPICAIS	22
1.1	INTRODUÇÃO	23
1.1.1	Crioconservação de embriões	26
1.1.2	Complexidade das estruturas embrionárias	28
1.1.3	Sensibilidade ao frio	30
1.1.4	Crioprotetores	31
1.2	OBJETIVOS	34
1.2.1	Objetivos gerais	34
1.2.2	Objetivos específicos	34
1.3	MATERIAL E MÉTODOS	34
1.3.1	Embriões	34
1.3.2	Coleta	35
1.3.3	Análise Morfológica	36
1.3.3.1	<i>Microscopia de luz</i>	36
1.3.3.2	<i>Colorações</i>	37
1.3.3.3	<i>Microscopia eletrônica de Varredura</i>	37
1.3.3.4	<i>Microscopia eletrônica de Transmissão</i>	37
1.3.4	Imagens	38
1.3.5	Análise estatística	38
1.4	REFERÊNCIAS	39
2	SENSIBILIDADE DE EMBRIÕES DE <i>Prochilodus lineatus</i> AO FRIO E AOS CRIOPROTETORES	42
2.1	RESUMO	43
2.2	INTRODUÇÃO	45
2.3	MATERIAL E MÉTODOS	48

2.3.1	Embriões.....	48
2.3.2	Avaliação da retirada do Córion.....	48
2.3.3	Teste de sensibilidade ao frio	49
2.3.4	Teste de toxicidade	50
2.3.5	Resfriamento	51
2.4	RESULTADOS	54
2.4.1	Avaliação da retirada do Córion.....	54
2.4.2	Sensibilidade ao frio	54
2.4.3	Toxicidade	56
2.4.4	Resfriamento	60
2.5	DISCUSSÃO	92
2.6	CONCLUSÕES	98
2.7	REFERÊNCIAS.....	99
3	CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE PEIXES NEOTROPICAIS PELO MÉTODO DE VITRIFICAÇÃO	103
3.1	RESUMO.....	104
3.2	INTRODUÇÃO	106
3.2.1	Dificuldades na crioconservação.....	108
3.3	MATERIAL E MÉTODOS	113
3.3.1	Embriões.....	113
3.3.2	Testes de vitrificação das soluções crioprotetoras.....	113
3.3.4	Vitrificação.....	113
3.4	RESULTADOS	117
3.4.1	Vitrificação das soluções crioprotetoras.....	117
3.4.2	Criopreservação e Descongelamento.....	118
3.5	CONCLUSÕES	125
3.6	REFERÊNCIAS.....	126

4	CONCLUSÃO GERAL.....	130
	APÊNDICES	131
	APÊNDICE A – ILUSTRAÇÕES METODOLÓGICAS.....	132
	APÊNDICE B – COLORAÇÕES.....	139

1 CRIOCONSERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE PEIXES NEOTROPICAIS



1.1 INTRODUÇÃO

Os Characiformes formam o maior grupo entre as espécies de peixes de água doce da América do Sul, apresentando destacada importância na pesca tanto comercial quanto de subsistência, na aquariofilia e na ecologia geral dos ecossistemas. Este táxon é formado por 14 famílias com aproximadamente 240 gêneros e 1460 espécies (SANTOS et al., 2004), sendo animais de hábito quase sempre diurno, que apresentam seus corpos totalmente recobertos por escamas, contendo um par de nadadeiras pélvicas situadas na região abdominal, uma nadadeira adiposa e uma nadadeira caudal com 19 raios. Neste grupo, faz-se ausente a presença de barbilhões ou filamentos ao redor da boca. Suas maxilas raramente são protráteis; e a forma do corpo, o comportamento e as cores são bastantes variáveis (SANTOS et al., 2004).

De acordo com Vazzoler (1996) os espécimes deste grupo são considerados peixes “r estrategistas”, ou seja, apresentam um pequeno ou nenhum cuidado parental ao longo de um prolongado período reprodutivo; com repetidos surtos reprodutivos e curtos tempos de procriação; desta forma, podem ser capturadas com idades menores, pois tem a capacidade de recuperar-se mais rapidamente dos efeitos da sobrepesca; contudo, são mais suscetíveis às variações ambientais durante seu período reprodutivo, o que acarreta em maiores riscos de sofrerem depleção de seus estoques pesqueiros em curto prazo.

Os Prochilodontidae compõem as 14 famílias pertencentes aos Characiformes, sendo facilmente caracterizados por apresentarem um corpo fusiforme. Possuem um intestino longo, bastante enovelado; estômago alongado e em forma de moela, isto é, com paredes grossas e lúmen estreito. Os representantes desta família têm hábito detritívoro, iliófago, matéria orgânica particulada, algas e perifiton. Eles apresentam a característica de formarem cardumes numerosos e realizarem grandes migrações reprodutivas e tróficas, podendo superar grandes obstáculos, como corredeiras e saltos. (SANTOS et al., 2004).

O *Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1837), comumente conhecido como Curimbatá ou Curimba, é uma espécie reofílica pertencente à família Prochilodontidae. Trata-se de um peixe de grande porte, atingindo até 8,2kg de ampla distribuição na bacia do rio Paraná, Paraguai e Paraíba do Sul. Possui um corpo alto e comprimido lateralmente, com boca circular, lábios espessos e móveis, dotados de inúmeros dentículos, adaptados a obter o alimento raspando o substrato. Possui uma coloração cinza esverdeada no dorso, flancos com linhas longitudinais escuras entre as séries de escamas, e um ventre prateado. Vive em ambientes lóticos, de águas calmas, e realiza migrações reprodutivas em grandes cardumes, percorrendo centenas de quilômetros, no período de setembro a janeiro (DIAS; SHIBATTA, 2006).

Ao longo do período reprodutivo, o último impulso para a maturação reprodutiva ocorre com grande rapidez, o que possibilita aos peixes aproveitarem as subidas repentinas dos níveis dos rios, às vezes, se realizando no intervalo de poucas horas. Para o *P. lineatus* a primeira maturação gonadal ocorre quando os indivíduos alcançam 24 cm de comprimento; e os espécimes formam grandes cardumes, que permanecem a tona d'água, produzindo um ruído característico e facilmente distinguido pelos pescadores. Sua desova se produz em plena correnteza do rio, começando, em geral, logo abaixo das cachoeiras (ROSA JUNIOR; SCHUBBART, 1945; VAZZOLER, 1996).

A partir do momento em que o seu comprimento/idade da primeira maturação sexual é atingido, as variáveis ambientais também passam a atuar sobre os indivíduos, de modo que as condições na época da desova sejam favoráveis à sobrevivência e crescimento da prole. Essas variáveis que determinam onde e quando cada espécie reproduz são denominados de fatores terminais. Elas devem assegurar, no período reprodutivo, uma disponibilidade de alimento adequado às fases iniciais de desenvolvimento. Dentre estes, incluem-se: fotoperíodo, temperatura, condutividade da água e pH (VAZZOLER, 1996).

Após a desova e a fecundação, os ovos e larvas dos Curimbatás são carregados pelas águas até as lagoas marginais, onde realizam seu desenvolvimento inicial. Tanto os jovens quanto os adultos se alimentam de

rotíferos, algas, detritos e, principalmente, de sedimentos obtidos na raspagem do perifíton ou da vegetação submersa (DIAS; SHIBATTA, 2006).

Contudo, ao retirar essas espécies reofílicas do seu ambiente natural e introduzirmos em ambiente artificial e/ou lântico, a maturação de suas gônadas é paralisada, não havendo desova e se tornando impossível, desta maneira, uma reprodução em cativeiro. Assim, manipulações ambientais e tratamentos hormonais são práticas comuns a fim de modificar o ciclo anual de reprodução e induzir esta reprodução em cativeiro. Muitos avanços foram feitos dentro dos tratamentos hormonais, tornando comum a prática da hipofiseção, onde os peixes são injetados com doses de extrato de hipófise em curtos intervalos de tempo, provocando a maturação das gônadas artificialmente (ROBLES et al., 2009; ROSA-JUNIOR; SCHUBBART, 1945; VAZZOLER, 1996).

O curimatá é uma espécie de grande importância ecológica, uma vez que sua abundância e reprodução massiva propiciam expressiva oferta de presas (ovos, larvas, alevinos e adultos) para outras espécies de peixes, répteis e mamíferos. Além disso, seu hábito alimentar possibilita o desenvolvimento de uma rede trófica a partir de organismos perifíticos e detritos. É uma das espécies mais importantes para a pesca comercial no alto Paraná, embora seja considerado pescado de segunda classe devido ao sabor de sua carne. Desde 1945 relatos de sua importância pesqueira é citada na literatura, como na Cachoeira das Emas em Pirassununga-S.P. onde capturou-se cerca de 75.000 quilos de Curimatá; e também, na bacia do rio Paraná entre 1994 e 2000, que em média, foram capturados 80 toneladas deste pescado, tendo seu pico em 1997 com 138 toneladas (DIAS; SHIBATTA, 2006).

Além da pesca predatória, outros fatores também promovem a redução dos estoques pesqueiros. Os represamentos, por exemplo, apresentam-se como um dos mais deletérios à ictiofauna, pois altera de maneira profunda e definitiva a dinâmica das águas e determinam consideráveis modificações nas comunidades bióticas nas suas áreas de influência. Para as comunidades de peixes, o resultado inevitável desses empreendimentos é a alteração na abundância das espécies com a eventual eliminação de alguns componentes ictiofaunísticos. Isso ocorre, pois as comunidades de peixes locais são

resultantes da colonização feita por espécies anteriormente presentes, que a partir das alterações ambientais passam a sofrer com a competição e predação das espécies naturalmente em baixas densidades que podem encontrar condições favoráveis e proliferarem-se. Isso se deve principalmente por: 1- a redução na área alagável e alterações no regime de cheias, fundamentais à desova e ao desenvolvimento das formas jovens; 2 - a alta densidade de peixes que se acumulam nas proximidades da barragem e a falta de abrigos que geralmente se constata nestas áreas levando a alta incidência de predadores e 3 - as grandes barragens levam, se nenhum dispositivo efetivo para a transposição de peixes for instalado, ao bloqueio do acesso de espécies migradoras às suas áreas de reprodução e ou alimentação (AGOSTINHO et al., 1989; GODINHO, et al., 1984; SHIBATTA et al., 2007).

Desta forma torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologias que promovam tanto uma maximização na produção pesqueira quanto uma manutenção dos estoques pesqueiros; sendo as técnicas de crioconservação (criopreservação e resfriamento) dos embriões de Teleósteos saídas efetivas para conservação das espécies (ROBLES et al., 2009).

1.1.1 Crioconservação de embriões

Os estudos de técnicas de conservação de gametas para a fertilização artificial são de grande valor em programas que envolvem o repovoamento dos rios e represas, produção intensiva de organismos aquáticos em fazendas de criação e também em programas de cunho conservacionista.

O termo criopreservação é utilizado para descrever o congelamento e o estoque por longos períodos de células vivas, tecidos e órgãos; enquanto que o resfriamento se refere à técnica de conservação do material biológico sob temperaturas reduzidas (sem congelamento) por períodos mais curtos. Os estudos iniciais sobre criopreservação de sêmen e ovos de peixes até meados do século passado se concentram no objetivo de prolongar a vida dos gametas no estado não congelado, enquanto que as pesquisas mais recentes têm focado o desenvolvimento de técnicas de congelamento profundo (-196°C), a fim de preservar a vida dos espermatozoides “indefinidamente” (NINHAUS-

SILVEIRA et al., 2007). O sucesso destas técnicas são bem estabelecidas apenas para espermatozoides de algumas espécies de peixes, entretanto a tecnologia para a criopreservação e resfriamento de ovócitos e embriões de teleósteos neotropicais ainda necessitam ser desenvolvidas e, seu desenvolvimento representaria um salto no crescimento do setor da produção piscícola (JAMIESON, 2009; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2003, 2006).

O uso da criopreservação para o manejo em pisciculturas requer uma metodologia simples, capaz de gerar altas taxas de sobrevivência embrionária e larval pós-descongelamento (ROBLES et al., 2009). O desenvolvimento destas tecnologias revolucionará a reprodução dos animais domésticos, assim como a reprodução humana nas últimas décadas, representando uma importante ferramenta para preservação do material genético materno e paterno (germoplasma), para o transporte de material genético e para facilitar a regeneração ou proliferação de linhas reprodutivas, além de prover uma metodologia para salvar as variabilidades genéticas naturais (JAMIESON, 2009; PULLIN, 2003).

A possibilidade de estocar embriões sem uma data para utilizá-los torna-se muito útil no manejo da reprodução, uma vez que a aquicultura é dependente dos períodos reprodutivos das espécies, que comumente apresentam uma reprodução sazonal (ROBLES et al., 2009).

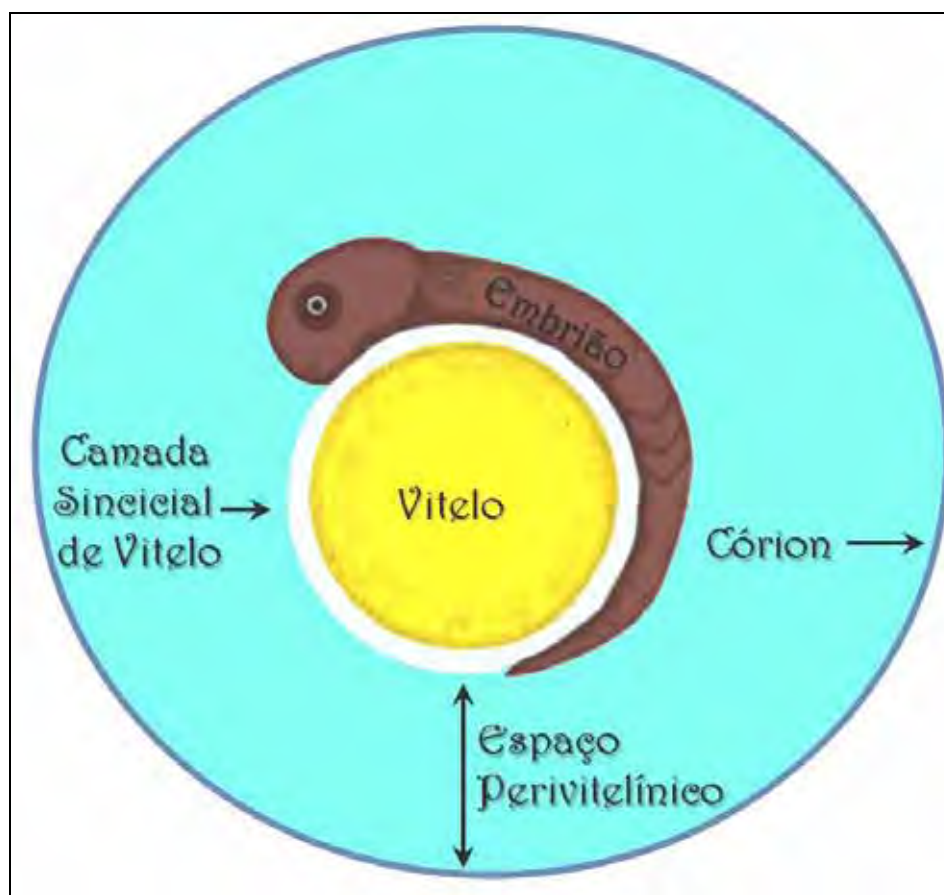
Criopreservação de espermatozoides é mais fácil e muito mais bem sucedido que o congelamento de embriões, contudo a criopreservação de embriões pode fornecer a única possibilidade de preservar o genótipo de machos e fêmeas, assim como os componentes citoplasmáticos da população original, incluindo a importante contribuição do DNA mitocondrial materno (ROBLES et al., 2009). Contudo há evidências que comprovam um grande decréscimo na capacidade de fertilização de espermatozoides congelados. Espermatozoides de Black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*), após serem criopreservados por 1, 7, 10 e 32 dias, apresentaram decréscimo em suas taxas de fertilização de 99.0, 93.2, 91.9 e 91.5% respectivamente. O sucesso desta biotecnologia depende principalmente da proteção contra as crioinjúrias durante o congelamento e descongelamento (JAMIESON, 2009), mantendo uma alta integridade do material biológico, o que viabiliza os processos de fecundação e desenvolvimento pós-tratamento.

1.1.2 Complexidade das estruturas embrionárias

Em peixes, como em outros pequenos vertebrados, os ovos possuem um polo vegetativo formado por uma grande quantidade de vitelo, quando comparado com o seu volume total, e por um polo animal, que sofre clivagens discoidais parciais após a fertilização. Os embriões são complexos sistemas biológicos com três diferentes compartimentos: um grande vitelo, um compartimento celular (o embrião propriamente dito) e o espaço perivitelínico. O vitelo é cercado por uma camada sincicial ou periblasto e, o espaço perivitelínico cerca estes compartimentos, limitado pela membrana coriônica (Figura 1), formada pela proteína coreogenina (JARAMILLO et al., 2012; ROBLES et al., 2009).

O tratamento sob-baixas temperaturas de alguns tecidos ou estruturas biológicas requerem o uso de soluções crioprotetoras específicas que tem a função de impedir a formação de cristais de gelo intra e extracelular protegendo os componentes celulares dos danos gerados pelas baixas temperaturas (NEVES, 2008; ROBLES et al., 2003). Contudo, as estruturas particulares dos embriões de peixes complicam a criopreservação devido a diferentes fatores como: um grande tamanho total e uma consequente baixa relação entre área/volume dificultando o influxo e efluxo da água e do crioprotetor necessário para o processo de congelamento/descongelamento; uma grande quantidade de vitelo; alta sensibilidade ao frio, e alta probabilidade de formação de cristais de gelo que promove a ruptura das membranas (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008; ROBLES et al., 2009). Além disso, os diferentes compartimentos diferem nas propriedades de permeabilidade; e finalmente, as membranas ao redor do embrião, que possuem diferentes taxas de osmolaridade e representam barreiras dificultando a troca da água pelos crioprotetores (ROBLES et al., 2009).

Figura 1 - Compartimentos embrionários



Fonte: Elaboração do próprio autor.

Um adequado equilíbrio entre a água e os crioprotetores é considerado a chave no processo de criopreservação, e muitos esforços têm sido realizados no estudo da permeabilidade dos embriões e no desenvolvimento de métodos para a permeabilização dos embriões. A membrana coriônica é primeira camada semipermeável, que mesmo permitindo a entrada de água e outras pequenas moléculas, como o DMSO, aumenta o tempo necessário para a difusão destas substâncias, tornando necessário o aumento do tempo de exposição do material biológico ou da concentração dos crioprotetores. Contudo, algumas espécies como o *Danio rerio* e o *Prochilodus lineatus*, conseguem se desenvolver após a retirada do córion, podendo então facilitar a entrada dos crioprotetores (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008; WESTERFIELD, 1993).

Os métodos aplicados para a avaliação da permeabilidade vão de análises de mudança do volume sofrido pelos embriões submetidos a

diferentes soluções, testes de flutuação baseado na variação de densidade sofrido pelo embrião durante a adição do crioprotetor e a troca com a água, o uso de isótopos marcados, até análise com ressonância magnética nuclear. A maioria dos estudos considera os embriões como uma esfera homogênea devido à dificuldade de avaliar as reais características dos vários compartimentos e, relatar os dados de permeabilidade dos embriões sem considerar as diferenças entre a blastoderme e o vitelo.

A avaliação da entrada dos crioprotetores separadamente nos dois compartimentos indica que a permeabilidade da água é similar no saco vitelínico e na blastoderme, mas a permeabilidade do crioprotetor é marcadamente maior na blastoderme que no saco vitelínico. Outros estudos sobre a permeabilidade de diferentes crioprotetores indicaram que o metanol, mas não DMSO ou Propilenoglicol (PROP), penetraram por todo embrião, incluindo o saco vitelínico. Estes resultados revelaram que a camada sincicial de vitelo e o saco vitelínico são as principais barreiras à permeabilidade (ROBLES et al., 2005, 2009; SUZUKI et al., 1995).

1.1.3 Sensibilidade ao frio

Um dos fatores que dificultam o congelamento dos embriões de peixes é a alta sensibilidade ao frio. Em função disso, inúmeros estudos foram desenvolvidos para observar, em diferentes espécies, os danos causados aos embriões quando submetidos a baixas temperaturas (DINNYÉS et al. 1998; ZHANG; RAWSON, 1995), pois ela exerce uma grande influência no metabolismo e no desenvolvimento ontogenético (GWO et al., 1995).

O congelamento lento, usualmente utilizado para criopreservação de amostras biológicas, exige um progressivo resfriamento das amostras, de sua temperatura fisiológica à temperatura de congelamento, promovendo um “supercooling” do material biológico antes de iniciar o processo de cristalização ou congelamento. Entretanto, as espécies neotropicais normalmente apresentam uma alta sensibilidade às baixas temperaturas devido à inibição dos processos metabólicos e enzimáticos dos embriões, que prejudicam seu desenvolvimento (DINNYÉS et al., 1998; GWO et al., 1995; NINHAUS-

SILVEIRA et al., 2008; ROBLES et.al., 2003, 2009 ZHANG; RAWSON, 1995) entretanto, o nível da sensibilidade é uma característica específica e do estágio embrionário, sendo comum verificar uma grande sensibilidade nos estágios iniciais de desenvolvimento, seguido por um progressivo decréscimo ao longo do desenvolvimento (DINNYÉS et al., 1998).

Apesar dos efeitos das temperaturas reduzidas, o resfriamento do material biológico próximo a 0°C pode ser efetuado, com certo grau de tolerância, quando utiliza-se tecnologias adequadas que preservem a integridade do material biológico. Assim, o resfriamento, busca retardar o desenvolvimento embrionário através de protocolos que preservem a viabilidade dos embriões por curtos períodos de tempo (ROBLES et al., 2009). Desta forma, Gwo et al (1995) ao expor embriões de Zebrafish à temperatura de 0°C por 18h ou 24 h em 1 M de metanol e 0,1 M de sacarose (SAC), obtiveram taxas de sobrevivência de 88% e 82% respectivamente; este efeito benéfico da solução crioprotetora pode ser útil para superar a desvantagem que a sensibilidade ao frio representa para os embriões congelados (GWO et al., 1995; ROBLES et al., 2009).

1.1.4 Crioprotetores

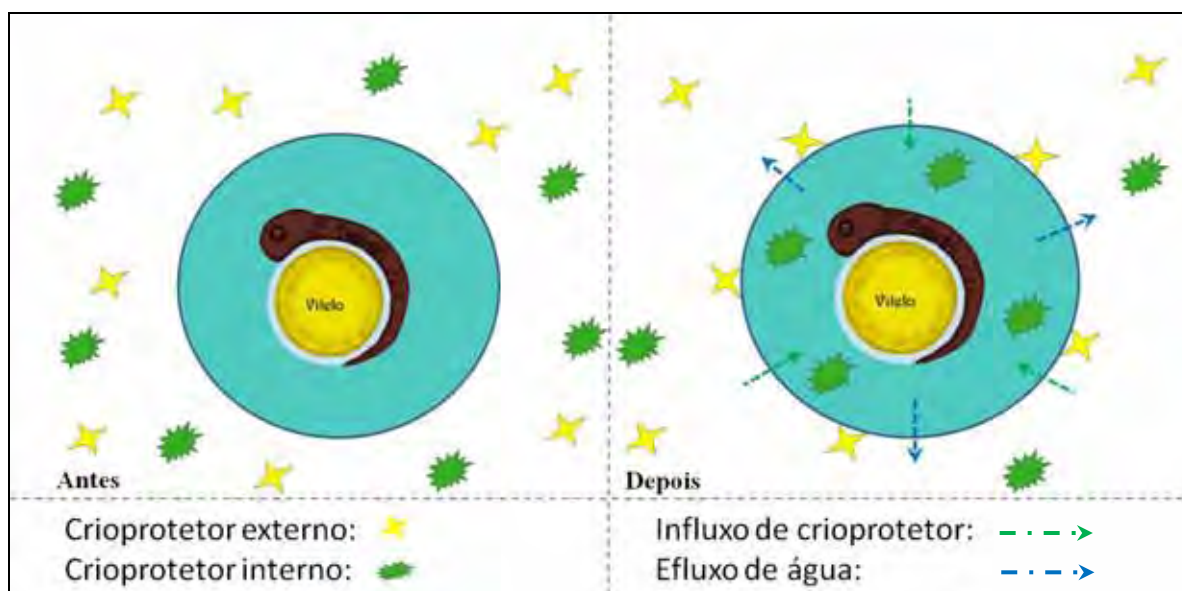
Os crioprotetores são substâncias que permitem a redução das soluções a temperaturas abaixo de zero, sem que ocorra a formação de grandes cristais de gelo. Cada solução, detem de um ponto crioscópico distinto, como o dimetil sulfóxido (DMSO) a – 19°C e o propileno glicol (PROP) a – 60°C. A redução do ponto crioscópico da solução, faz com que o líquido entre em um estado de “supercooling”, ou seja, apesar da reduzida temperatura a solução permanece em estado líquido, promovendo um “salto” sob a faixa que ocorre a nucleação do gelo (0°C à -40°C) (CABRITA et al., 2003; SIGMA-ALDRICH, 2012).

Os crioprotetores são divididos em dois grupos: os que difundem através das membranas celulares (dimetil sulfóxido - DMSO, metanol - MET, propileno glicol - PROP, glicerol - GLI, etc.), conhecidos como crioprotetores internos e os que não penetram na célula (inúmeros açúcares e proteínas) que são os

crioprotetores externos, realizando a manutenção da pressão osmótica (Figura 2). (JAMIESON, 2009; STREIT-JR et al., 2007; ZHANG; RAWSON, 1995).

Uma das informações básicas para o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação é a toxicidade dos agentes crioprotetores sobre a amostra em estudo, que aumenta junto ao tempo de exposição, a temperatura da solução, a concentração, as propriedades químicas dos crioprotetores e o estágio embrionário da espécie, refletindo a necessidade dos estudos de toxidez para cada espécie em particular (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008; ROBLES et al., 2004, 2009; SUZUKI et al., 1994; ZHANG; RAWSON, 1995).

Figura 2 - Atuação dos crioprotetores em embriões de peixes.



Fonte: Elaboração do próprio autor.

Segundo Suzuki et al. (1994) o DMSO é um melhor crioprotetor para as células germinativas que o glicerol, provavelmente porque sua taxa de difusão, através das membranas celulares, ocorrem mais rápido, um processo que é muito menos dependente da temperatura para o DMSO que para o glicerol. Nos embriões de peixes sua concentração interna sofre um aumento significativo nos primeiros 10 minutos de imersão na solução, e posteriormente uma redução no intervalo de 10 a 20 minutos, que finalmente vai gradativamente aumentando novamente até equilibrar as concentrações internas e externas. Contudo, propriedades de ativação gênica deste

crioprotetor tem sugerido cuidado no seu uso para embriões humanos e efeitos genéticos na criopreservação de embriões de peixes requerem maiores investigações. Os efeitos tóxicos do DMSO têm sido verificados quando usado em altas concentrações ou quando o tempo de exposição é estendido (JAMIESON, 2009; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008; ROBLES et al., 2005). Contrapondo-se ao crioprotetor de baixo peso molecular, o glicerol é o menos tóxico dos crioprotetores, mas o menos permeável às membranas fosfolipídicas. Assim, o seu uso tende a demorar mais para equilibrar as concentrações intra e extracelulares, aumentando a probabilidade de crioinjúrias a partir estresse osmótico. Já o metanol foi considerado como o mais tóxico dos crioprotetores e foi estabelecido completamente ineficaz na criopreservação de espermatozoides de algumas espécies (JAMIESON, 2009). Contudo, Zhang e Rawson (1995) descreveram que o metanol gerou resultados mais eficazes que o DMSO no resfriamento dos embriões de Zebrafish, enquanto que para o *Piaractus mesopotamicus*, os resultados foram melhores utilizando o metanol associado à sacarose (STREIT-JR et al., 2007;).

Alguns autores (NEVES, 2008; ROBLES et al., 2003, 2004) relatam que a associação de diferentes crioprotetores promove melhores resultados no tratamento de resfriamento, sendo os oligossacarídeos, como a sacarose, detentores de resultados mais efetivos que os monossacarídeos (glicose). Este fato possivelmente está associado a sacarose ter um efeito adicional de proteção celular sobre outros açúcares de cadeia mais simples, por provocar uma maior desidratação nos embriões e aumenta à viscosidade média do meio, evitando assim à formação de cristais de gelo (NEVES, 2008; ROBLES et al., 2003, 2004; STREIT-JR et al., 2007).

Desta forma, entendemos que este estudo visou fornecer informações importantes para compreendermos os vários processos biológicos que envolvem o desenvolvimento de tecnologias para a crioconservação dos embriões de teleósteos, fato este ainda não foi descrito com êxito na literatura. Assim objetivamos descrever um protocolo viável para crioconservação de embriões de peixes neotropicais avaliando a toxicidade dos crioprotetores e a sensibilidade do material biológico às baixas temperaturas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivos gerais

Descrever um protocolo viável para a crioconservação de embriões de peixes neotropicais.

1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a resistência de três fases embrionárias de *Prochilodus lineatus* às baixas temperaturas (seção 1).
- Avaliar a melhor concentração crioprotetora sobre o desenvolvimento embrionário de *Prochilodus lineatus* (seção 1).
- Descrever um protocolo de vitrificação efetivo (seção 2).
- Avaliar os danos externos e internos dos embriões expostos aos tratamentos criogênicos (seção 1 e 2).

1.3 MATERIAL E MÉTODOS

1.3.1 Embriões

Os embriões de *Prochilodus lineatus* foram obtidos por reprodução artificial de exemplares adultos e maduros do plantel de reprodutores existente no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais - CEPTA/ICMBIO, Pirassununga, São Paulo. Os gametas (Figuras 32a e 32b) foram obtidos por massagens abdominais de animais com características reprodutivas secundárias de peixes migradores, como ventre abaulado e macio, orifício urogenital avermelhado e intumescido e os machos liberando sêmen com uma leve pressão no abdômen. Posteriormente, eles foram

induzidos com injeções intra-celomáticas de uma solução de GnRHm associada ao inibidor da dopamina, o metoclopramide (Ovopel – D-Ala⁶,Pro⁹ Net-mGnRH), na posologia utilizou-se duas doses nas fêmeas (0,5 e 5,0 mg/Kg), com um intervalo de 10 horas, e dose única aos machos (1,0 mg/Kg), coincidindo com a segunda da fêmea.

Na fertilização, foi utilizado o método “a seco” (Figura 32c), no qual os oócitos foram misturados ao sêmen sem contato com a água, e posteriormente adicionado água para ativação dos espermatozoides e hidratando os embriões (Figura 32d). Após a lavagem e retirada do excesso de sêmen, os embriões foram depositados e mantidos em incubadoras verticais de 60 litros com fluxo contínuo de água a uma temperatura média de 26°C. Para o experimento, foram utilizadas um pool de oócitos de 4 fêmeas de 1300 g cada e três machos de 350 g cada para obtenção dos embriões, visando desta forma, mitigar um possível erro nos resultados obtidos decorrentes das características genéticas dos espécimes escolhidos.

Para os futuros testes, os embriões foram selecionados (Figura 33b), retirando com a ajuda de uma pipeta Pasteur descartável todos os embriões inviáveis (Mortos) (Figura 33a). Para cada amostragem experimental posterior, estimou-se por 10 (dez) contagens consecutivas uma média de 139 ± 11 embriões, que correspondem ao volume de 10 mL em um Becker de 25 mL (Figura 34). Dois estágios e três fases embrionárias foram avaliadas: Gastrulação (fechamento do Blastóporo) e Organogênese com 6 e 20 somitos.

A incubação dos embriões foi realizada em incubadoras de PVC (Anexo 4a e 4b) montadas através de anéis de tubos de cloreto de polivinila-PVC de 100 mm de diâmetro e 10 cm de altura, tendo uma de suas extremidades recobertas com uma fina tela de polietileno com diâmetro de 0,45 µm entre nós, que permite o fluxo contínuo de água, mas evita a saída dos embriões e larvas. Em sua face livre, foram fixados dois flutuadores (espuma ou isopor) que proviam a flutuação e a estabilidade das incubadoras nos tanques de fluxo contínuo (Figura 35b).

1.3.2 Coleta

Os embriões expostos aos testes de resfriamento foram coletados após

12 h de desenvolvimento em tanques de fluxo de água contínuo, enquanto que os embriões vitrificados foram coletados logo após o descongelamento.

1.3.3 Análise Morfológica

As amostras foram fixadas, logo após os experimentos, em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2% em tampão fosfato Sorensen 0,1 M pH 7,2 (Karnovsky), por um período de vinte e quatro horas. Cada amostra embrionária coletada foi analisada e fotografada “in toto” em estereomicroscópio Leica M212 com sistema de foto MOTICAM 2500 – 5.0 MPixel USB 2.0, com o objetivo de avaliar suas características morfológicas como tamanho corpóreo, curvatura da coluna, vesícula óptica e ótica e nadadeiras embrionárias.

1.3.3.1 Microscopia de luz

As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2% em tampão fosfato Sorensen 0,1 M pH 7,2 (Karnovsky), “over night”. Depois de fixado, o material permaneceu em álcool 70% por 24h seguido por um banho em álcool 95% por mais 4 h, visando à desidratação do material. Posteriormente, iniciou-se um processo de infiltração dos embriões por uma solução de resina mais álcool por 5 h, seguido por uma imersão em resina pura, “over-nigth”. Após a infiltração, a inclusão ocorreu em metacrilato glicol (Historesina Leica), o que permitiu uma melhor preservação estrutural do embrião. Para a confecção das lâminas histológicas, o material biológico, já incluído, foi submetido a cortes de 3 e 5 μ m de espessura, obtidos em um micrótomo equipado com navalha de vidro LEICA RM 2245. Os cortes assim preparados foram observados ao Microscópio óptico Zeiss Axio Scope A1 e fotografadas com máquina fotográfica Axiocam MRc5. As amostras foram fixadas, processados e analisadas no Laboratório de Ictiologia Neotropical (L.I.NEO), do Departamento de Biologia e Zootecnia, FE, UNESP, Campus de Ilha Solteira.

1.3.3.2 Colorações

Utilizou-se como metodologias tintoriais os protocolos de azul de toluidina, hematoxioina-eosina, ácido periódico de Schiff (PAS), Metanil Yellow, Hematoxilina (Apêndice B).

1.3.3.3 Microscopia eletrônica de Varredura

Os embriões foram fixados em solução de Glutaraldeído 2,5%, permanecendo em geladeira até o momento da desidratação, e posteriormente encaminhada para o processamento no Centro de Microscopia Eletrônica do instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu. A desidratação ocorreu em série crescente de álcool, passando pelas concentrações de 7,5, 15, 30 e 50% em dois banhos de 10 minutos cada, 70, 80, 90% com dois banhos de 15 minutos cada e 100% em dois banhos de 10 minutos. A secagem foi em aparelho de Ponto Crítico Balzers Union, utilizando CO₂ líquido, seguido pela montagem dos embriões em bases metálicas de alumínio (stubs), posteriormente, foram metalizadas com íons ouro-paládio em um Metalizador MED 010 da Balzers Union. O material foi examinado e elétron-micrografado em Microscópio Eletrônico de Varredura SEM QUANTA 200, no Centro de Microscopia Eletrônica do instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu.

1.3.3.4 Microscopia eletrônica de Transmissão

Os embriões foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2% em solução de tampão fosfato Sorensen 0,1 M pH 7,2 (Karnovsky), sendo encaminhados para o processamento no Centro de Microscopia Eletrônica do instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu. O material foi lavado em três banhos de 15 minutos em solução de tampão fosfato a 0,1 M com pH 7,4, sendo, posteriormente, pós-fixado em solução de Tetróxido de ósmio a 1% por 2 horas, lavados três vezes em água destilada por cinco 5 minutos cada, contrastados em solução aquosa de

acetato de uranila 0,5% por 2 horas, desidratação em uma sequência crescente de solução de acetona e incluídos em Resina Epóxi (Araldite).

Os Cortes ultrafinos foram colhidos em grades de cobre, contrastados em acetato de uranila, lavados em álcool 50% e recontrastados com citrato de chumbo. Os cortes assim preparados foram analisados e elétron-micrografados ao Microscópio eletrônico de transmissão Phillips-CM100.

1.3.4 Imagens

Os experimentos exterior ao Laboratório de Ictiologia Neotropical (Lineo) foram fotografados por meio de uma câmera digital Sony Cyber-Shot DSC-H50; enquanto que os esquemas foram produzidos através do programa Google SketchUp Pro 8.

1.3.5 Análise estatística

Todos os tratamentos foram realizados inteiramente ao acaso com três repetições, contando com 139 ± 11 embriões cada amostra. Em cada uma das amostras estimou-se o número de Larvas vivas (LV) e o número de larvas inviáveis (LI), sendo considerados como larvas inviáveis as que apresentavam notocorda com curvatura e corpo reduzido. Para verificar o nível de interação entre as variáveis foi utilizado o programa estatístico SISVAR 5.3 (Build 75 - 2010), aplicando-se um teste de ANOVA, ao nível de 5% de significância ($\alpha=0,05$) e teste de Scott-Knott para as variáveis que apresentaram diferenças significativas.

1.4 REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, Â. A.; JÚLIO-JR, H. F.; BORGHETTI, J. R. Considerações sobre os impactos dos represamentos na ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de caso: reservatório de Itaipu. **Revista Unimar**, Maringá, n. 14, Supl., p. 89-107, jun. 1998.

DINNYÉS, A.; URBÁNYI, B.; BARANYAI, B. Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the present or absence of cryoprotectants: work in progress. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 50, n. 1, p. 1-13, 6 mar. 1998.

GODINHO, H. M.; ROMAGOSA E.; CESTAROLLI M. A.; NARAHARA M. Y.; FRENERICH-VERANI N. Reprodução induzida de curimatã (*Prochilodus scrofa*), Steind. 1881, sob condições de cultivo experimental. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, n. 8, p. 113-119, 1984.

GWO, J. C.; JAMIESON, B. G. M.; LEUNG, L. K. P. Live preservation of fish gametes. In: JAMIESON, B G M. **Reproductive biology and phylogeny of fishes (agnathans and bony fishes)**. Queensland: Science Publishers, 2009. Cap. 11, p. 395-484.

GWO, J. C.; STRAWN, K.; ARNOLD, C. R. Changes in mechanical tolerance and chilling sensitivity of red drum (*Sciaenopus ocellatus*) embryos during development. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 43, n. 7, p. 1155-1161, 1995.

NEVES, P. R. **Utilização de crioprotetores intra e extracelulares em embriões de pacu (*Piaractus mesopotâmicus*)**. 2008. 71 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.

NINHAUS-SILVEIRA, A. **Desenvolvimento embrionário e preservação criogênica de embriões do curimatã *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Teleostei; Prochilodontidae)**. 2004. 99 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Cryopreservation of trout semen: diluent, straw and vapor column. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 135-139, 23 abr. 2003.

NINHAUS-SILVEIRA, A. Preservação de gametas de peixes e suas aplicações. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**, Medellín, v. 20, n. 4, p. 516-517, 2007.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A.; AGOSTINHO, C. A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Cryogenic preservation of embryos of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes; Prochilodontidae). **Zygote**, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 45-55. 20 jun. 2008.

NINHAUS-SILVERIA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; SENHORINI, J. A.; ALEXANDRE, J. S.; CHAGURI, M. P. Fertilidade do sêmen de Matrinxã (*Brycon amazonicus*) criopreservado em nitrogênio líquido. **Boletim Técnico Do Cepta**, Pirassununga, v. 19, p. 1-8, 2006.

PULLIN, R. S. V. Ex-situ conservation of the germplasm of aquatic organisms. **Naga**, Penang, v. 16, n. 2/3, p. 15-17, Jul. 2003.

REIS, R.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS-JR, Carl J. **Check list of the freshwater fishes of south and central america**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. 742 p.

ROBLES, V.; CABRITA, E.; ACKER, J. P. Embryo cryopreservation: what we know until now. In: CABRITA, E.; ROBBLES, V.; HERRÁEZ, P. (Comp.). **Methods in reproductive aquaculture**. New York: Taylor & Francis, 2009. Cap. 9, p. 265-294.

ROBLES, V.; CABRITA, E.; FLETCHER, G. L.; SHEARS, M. A.; KING, M. J.; HERRÁEZ, M. P. Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 64, n. 7, p. 1633-1646, 2005.

ROBLES, V.; CABRITA, E.; PAZ, P.; CUÑADO, S.; ANEL, L.; HERRÁEZ, M. P. Effect of a vitrification protocol on the lactate dehydrogenase and glucose-6-phosphatase dehydrogenase activities and the hatching rates of Zebrafish (*Danio rerio*) and turbot (*Scophthantalmus maximus*) embryos. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 61, n. 7/8, p. 1367-1379, 5 Aug. 2004.

ROBLES, V.; CABRITA, E.; REAL, M.; ÁLVAREZ, R.; HERRÁEZ, M. P. Vitrification of turbot embryos: preliminary assays. **Cryobiology**, Maryland Heights, n. 47, n. 1, p. 30-39, 19 July 2003.

ROSA-JR, H.; SCHUBBART, O. Anotações sobre a biologia do curimatá ("Prochilodus") do rio Mogi-Guaçu, São Paulo. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 4, p. 541-555, dez. 1945.

SANTOS, G. M.; MÉRONA, B.; JURAS, A. A.; JÉGU, M. **Peixes do baixo rio Tocantins: 20 anos depois da usina hidrelétrica de Tucuruí**. Brasília, DF: Eletronorte, 2004. 216 p.

SHIBATTA, O. A.; DIAS J. H. P. **40 Peixes do Brasil: CESP 40 anos**. Rio de Janeiro: Dois, 2006. 208 p., 37 fotos.

SHIBATTA, O. A.; GEALH, A. M.; BENNEMANN, S. T. Ictiofauna dos trechos alto e médio da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**, Londrina, v. 7, n. 2, p. 125-134, 28 maio 2007.

STREIT-JR. D. P.; DIGMAYER, M.; RIBEIRO, R. P.; SIROL, R. N.; MORAES, G. V.; GALO, J. M. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de

resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, n. 42, n. 8, p. 1199-1202, ago. 2007.

SUZUKI, T.; KOMADA, H.; TAKAI, R.; KEIJI, A.; KOZIMA, T. T. Relation between toxicity of cryoprotectant DMSO and its concentration in several fish embryos. **Fisheries Science**, Tokyo, v. 61, n. 2, p.193-197, 3 Mar. 1994.

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e pratica**. Maringa: EdUEM, 1996.

ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Studies on chilling sensitivity of Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Embryos. **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 32, n. 3, p. 239-246, 1995.

2 SENSIBILIDADE DE EMBRIÕES DE *Prochilodus*

***lineatus* AO FRIO E AOS CRIOPROTETORES**

(Relacionado aos objetivos 1, 2 e 4)



2.1 RESUMO

A criopreservação de embriões de peixes neotropicais ainda é uma técnica muito complexa e com poucos resultados favoráveis devido a alta sensibilidade às baixas temperaturas e a toxicidade das soluções crioprotetoras. Assim, objetivou-se estabelecer um protocolo viável para o resfriamento de embriões de peixes neotropicais utilizando como modelo biológico *Prochilodus lineatus*. Os embriões foram avaliados quando a sua sensibilidade às temperaturas de 0 e 5°C por 12 horas, à toxicidade dos crioprotetores DMF 5 M, DMSO 5 M, PROP 5 M e GLI 5 M e aos protocolos de resfriamento nos estágios de gastrulação (fechamento do blastóporo) e organogênese com seis e vinte somitos. A retirada da membrana coriônica não demonstrou nenhuma influência significativa sobre o desenvolvimento embrionário de *Prochilodus lineatus*; contudo, o material biológico demonstrou uma alta sensibilidade às baixas temperaturas nas fases iniciais de desenvolvimento, sendo reduzida nos estágios embrionários posteriores; assim, a fase de organogênese com 20 somitos apresentou a menor sensibilidade ao frio. Dentre as soluções crioprotetoras avaliadas, o propileno glicol foi o crioprotetor que deteve a menor toxicidade sendo uniforme em todas as fases embrionárias; entretanto, apesar dos resultados obtidos pelo propileno glicol, a toxidez dos crioprotetores também variou inversamente ao tempo de desenvolvimento embrionário, sendo menor nas fases com maior tempo de desenvolvimento. Os tratamentos de resfriamento apresentaram altas taxas de sobrevivência nas fases de organogênese, contudo, quase que em sua totalidade, essas larvas apresentavam graves defeitos de má-formação como coluna torta, dimensões reduzidas do corpo e uma natação pouco vigorosa, concluindo assim que nenhuns dos protocolos aqui empregados são viáveis aos embriões do curimatá. Assim concluímos que os embriões de *P. lineatus* apresentam menor sensibilidade ao frio e grande toxicidade aos crioprotetores nas fases mais adiantadas de desenvolvimento embrionário, sendo inviável, com os protocolos apresentados, uma tecnologia de resfriamento para embriões de curimatá.

Palavras-Chave: Crioprotetor. Toxicidade. Curimbatá. Dimetil sulfóxido. Propileno glicol.

2.2 INTRODUÇÃO

A criopreservação de embriões de peixes ainda é uma técnica muito complexa e com poucos resultados favoráveis. Algumas características embrionárias como uma grande relação entre a área do embrião e o seu volume, diferença de permeabilidade de suas membranas, alta sensibilidade dos embriões às baixas temperaturas e um complexo sistema de compartimentos (espaço perivitelino, vitelo, camada sincicial de vitelo e blastoderme) facilitam a nucleação de cristais de gelo alterando as características morfofisiológicas embrionárias (HAGEDORN et al., 1997, 1998; ROBLES et al., 2009).

Assim, o tratamento sob baixas temperaturas de alguns tecidos ou estruturas biológicas requerem o uso de específicas soluções crioprotetoras, que ao difundir-se para o interior celular, inibem a formação dos cristais de gelo protegendo os componentes celulares (NEVES, 2008). Essas substâncias agem reduzindo o ponto crioscópico de uma solução, permitindo o não congelamento das soluções aquosas em uma faixa de temperatura abaixo de zero grau (“supercooling”) (GWO et al., 2009; ROBLES et al., 2003). Baseados na ação dos crioprotetores, estas soluções são divididas em dois grupos: os que se difundem através das membranas celulares (crioprotetores internos) como o dimetil sulfoxido, metanol, propileno glicol (PROP), glicerol (GLI), entre outros; e as soluções que atuam externamente à membrana plasmática como a sacarose, a gema de ovo, entre outros (crioprotetores externos) e realizam a manutenção da pressão osmótica e ajudam a impedir as injúrias provocadas às membranas (GWO et al., 2009; PALASZ et al., 2000; STREIT-JR et al., 2007; ZHANG; RAWSON, 1995).

A concentração do crioprotetor é a chave dos processos de criopreservação, pois torna-se necessário uma concentração (osmolaridade) da solução crioprotetora que previna os danos causados pelas baixas temperaturas impedindo a nucleação dos cristais de gelo, e que não seja deletéria aos embriões. Desta forma, muitos são os estudos sobre a permeabilidade dos embriões e sobre o desenvolvimento de métodos para a

permeabilização dos embriões (HARVEY et al., 1983; NEVES et al. 2012; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008; ROBLES et al., 2009; SUZUKI et al., 1995).

A concentração de substâncias crioprotetoras antes de atingir a sua estabilidade interna no embrião de zebrafish sofre uma variação em que sua concentração aumenta significativamente nos primeiros 10 minutos após a imersão na solução, contudo, entre os dez e vinte minutos seguintes sofre uma redução gradativa seguida por um lento aumento até atingir o equilíbrio entre a solução do meio interno e externo (ADAM et al., 1993). A velocidade de penetração dos crioprotetores depende da diferença de concentração externa e interna das substâncias, sua área de superfície e seu coeficiente de permeabilidade. Junto à difusão dos crioprotetores, observa-se à saída da água através das membranas do embrião devido a uma pressão osmótica durante os primeiros períodos pós-imersão; uma crenação do volume embrionário pode ser verificado (SUZUKI et al., 1995).

Os métodos aplicados para a avaliação da permeabilidade vão de análises de mudança do volume sofrido pelos embriões submetidos a diferentes soluções; testes de flutuação baseado na variação de densidade sofrida pelo embrião durante a adição do crioprotetor e a troca com a água; o uso de isótopos marcados (^{14}C e ^3H) e até análise com ressonância magnética nuclear (CABRITA et al., 2002; HARVEY et al., 1983). A maioria dos estudos consideram os embriões como uma esfera homogênea devido à dificuldade de avaliar as características dos vários compartimentos, e relatar os dados de permeabilidade dos embriões sem considerar as diferenças entre o blastoderme e o vitelo (CABRITA et al., 2003). A avaliação da entrada dos crioprotetores separadamente nos dois compartimentos indica que a permeabilidade da água é similar no saco vitelínico e na blastoderme, mas a permeabilidade do crioprotetor é marcadamente maior na blastoderme que no saco vitelínico (CABRITA et al., 2002). A primeira camada a representar uma barreira à difusão dos crioprotetores é a membrana coriônica, que tem a função de proteção mecânica para o embrião, e que alguns autores buscam retirar-las, através do uso de soluções enzimáticas de Pronase, antes dos passos da crioconservação, sem demonstrar alteração significativa ao desenvolvimento

embrionário (CABRITA et al., 2003; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008; ROBLES et al., 2009). Contudo, estudos sobre a permeabilidade de alguns crioprotetores internos e da conservação das ultraestruturas embrionárias pós-criopreservação indicaram que a camada sincicial de vitelo e o saco vitelínico são as principais barreiras à permeabilidade (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008; SUZUKI et al., 1995; ROBLES et al., 2005, 2009).

A sensibilidade dos embriões ao frio é um dos fatores que dificultam os tratamentos de crioconservação. Em função disso, inúmeros estudos foram desenvolvidos para observar, em diferentes espécies, os danos causados aos embriões quando submetidos a baixas temperaturas (DINNYÉS et al. 1998; ZHANG; RAWSON, 1995). A temperatura exerce uma grande influência no metabolismo e no desenvolvimento ontogenético (GWO et al., 1995), contudo essa sensibilidade é específica da espécie e do tipo de célula. Em todas as espécies estudadas uma grande sensibilidade ao frio foi observada nos estágios iniciais de desenvolvimento que progressivamente decresce durante o desenvolvimento, pois as taxas de eclosão pós-resfriamento são inversamente proporcionais às baixas temperaturas e ao tempo de exposição (DINNYÉS et al., 1998). A grande sensibilidade para baixas temperaturas foi relatada pela inibição dos processos metabólicos e enzimáticos, que podem ser prejudiciais para o rápido desenvolvimento dos embriões (GWO et al., 1995; DINNYÉS et al., 1998; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008; ROBLES et al., 2003, 2009; ZHANG; RAWSON, 1995).

Por sua vez, as soluções crioprotetoras que tem como função evitar os danos oriundos das baixas temperaturas, podem tornar-se deletérias ao desenvolvimento embrionário dependendo do tempo de exposição, temperatura e concentração das soluções crioprotetoras, sendo o efeito de cada crioprotetor espécie-específico e dependente de suas propriedades químicas e do estágio embrionário exposto. (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008; ROBLES et al., 2004, 2009; SUZUKI et al., 1994; ZHANG et al., 2004; ZHANG; RAWSON, 1995). Alguns protocolos descritos relatam a associação de diferentes crioprotetores (internos e externos) promovendo melhores resultados no tratamento de resfriamento, e que, os oligossacarídeos, como a sacarose, geram resultados mais efetivos que os monossacarídeos (glicose). Este fato

pode estar relacionado à sacarose ter um efeito adicional de proteção celular sobre outros açúcares de cadeia mais simples, por provocar uma maior desidratação nos embriões aumentando a viscosidade média, evitando assim a formação de cristais de gelo (NEVES, 2008; ROBLES et al., 2003, 2004; STREIT-JR et al., 2007).

Desta forma, este trabalho teve como objetivos avaliar a sensibilidade de embriões de *P. lineatus*, em diferentes fases embrionárias, ao frio e a soluções crioprotetoras.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

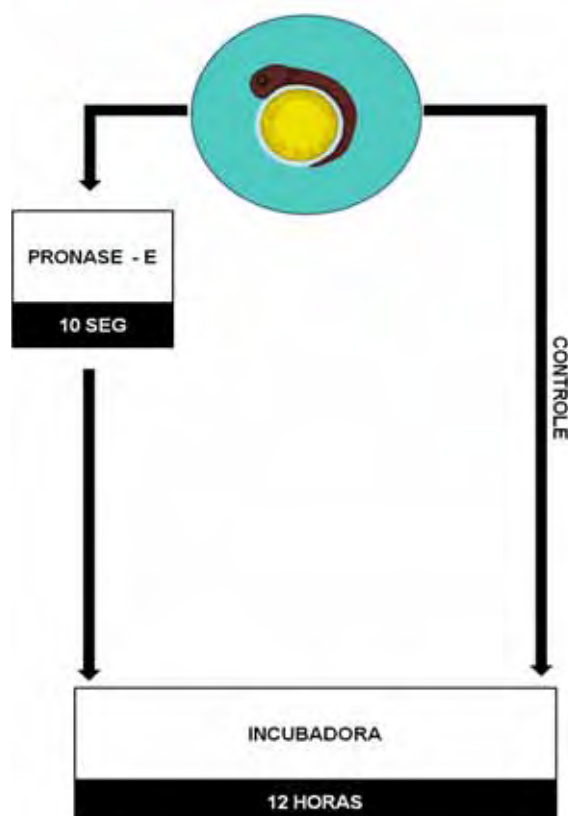
2.3.1 Embriões

Descrito na etapa anterior do trabalho.

2.3.2 Avaliação da retirada do Córion

Avaliou-se, no estágio de gastrulação, o efeito da retirada do córion sobre o desenvolvimento embrionário do *Prochilodus lineatus*. Desta forma, quatro amostras de embriões foram depositadas em incubadoras-PVC; e expostos a uma solução aquosa de Pronase-E (Sigma-Aldrich) a 0,15 mg/mL por um período de dez segundos (Figura 3). Enquanto que, o controle foi realizado com quatro amostras de embriões depositadas em incubadoras-PVC e levadas aos tanques de 1000 L para continuar seu desenvolvimento.

Figura 3 – Organograma da extração da membrana coriônica.

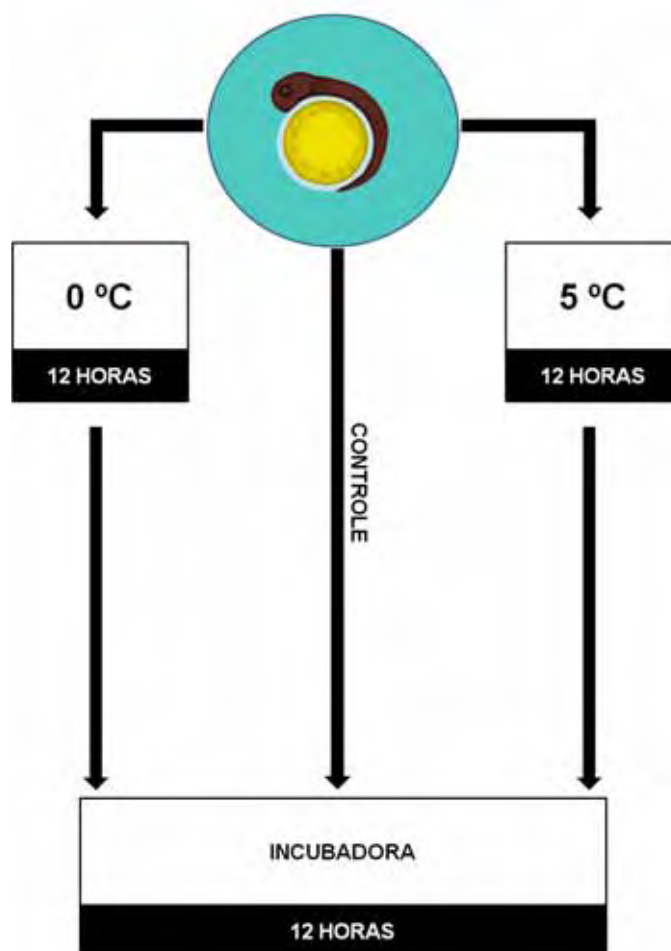


Fonte: Elaboração do próprio autor.

2.3.3 Teste de sensibilidade ao frio

Os embriões foram acondicionados em beakers de 250 ml juntamente a 150 ml de água do ambiente e levados a duas incubadoras do tipo B.O.D.-Cienlab, onde permaneceram por um período de 12 h as temperaturas de 5 e 0°C, sem a presença de qualquer substância crioprotetor (Figura 4). Após este período, todas as amostras foram depositadas em incubadoras-PVC e depositadas em tanques de 1000 L para continuar seu desenvolvimento. O controle foi realizado mantendo o desenvolvimento dos embriões a temperatura ambiente.

Figura 4 - Organograma do teste de Sensibilidade ao Frio.



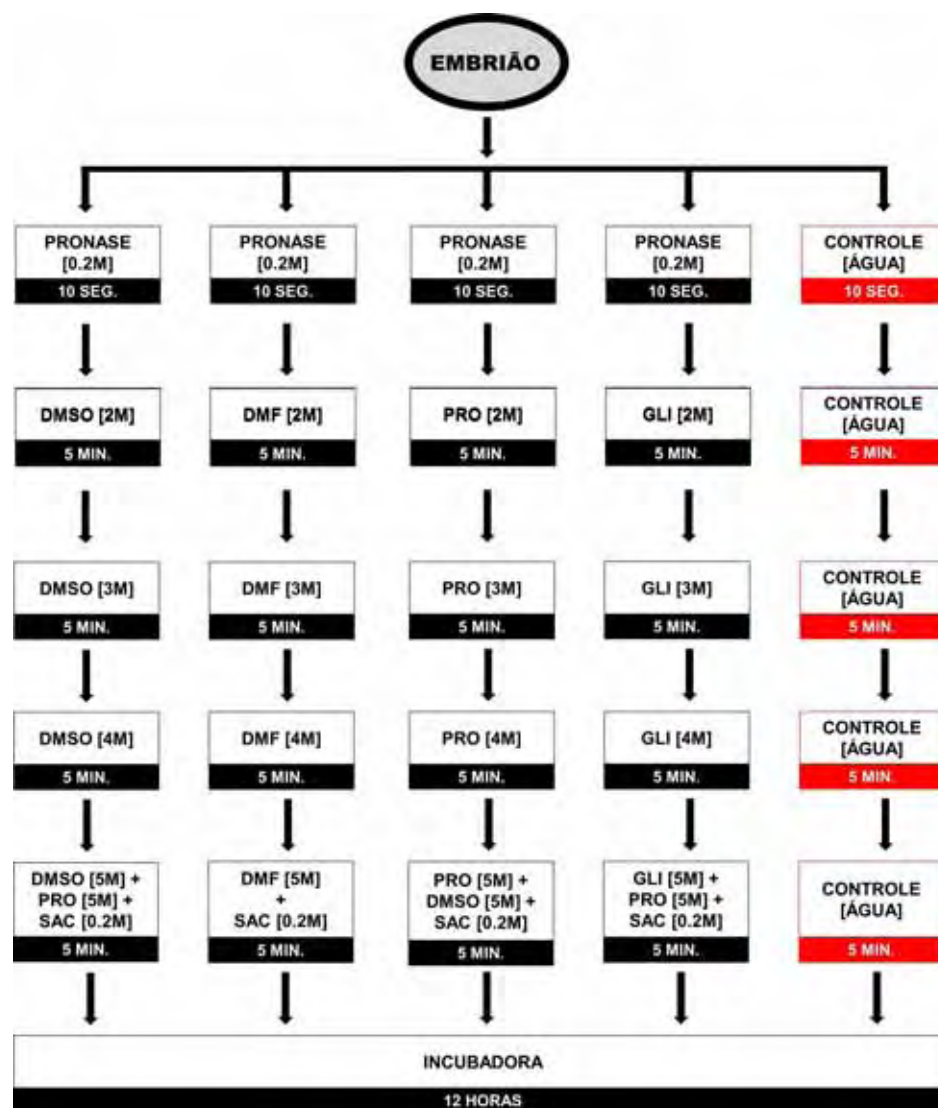
Legenda: Temperatura de 0°C e 5 °C, o controle à temperatura ambiente 26°C. **Fonte:** Elaboração do próprio autor.

2.3.4 Teste de toxicidade

Os embriões foram acondicionados em incubadoras-PVC e expostos a quatro séries de soluções crioprotetoras; cada teste foi inicializado com a retirada do Córion, através da enzima Pronase-E, após o qual seguiam por banhos de crescente molaridade do crioprotetor principal e posteriormente com uma associação de crioprotetores externo e interno(s) (Figura 5 e 36). Por fim, os embriões foram lavados em água corrente e acondicionados em tanques de fluxo contínuo de 1000 L, para continuar seu desenvolvimento embrionário por

um período de doze horas. O experimento foi controlado realizando todas as etapas experimentais apenas com água. Os crioprotetores avaliados foram: Dimetil sulfóxido (DMSO), Propileno glicol (PROP) e Dimetil formamida (DMF) da Sigma-Aldrich, Glicerol (GLI) da Merck e Sacarose (SAC) da Dinâmica.

Figura 5 - Organograma do teste de toxicidade



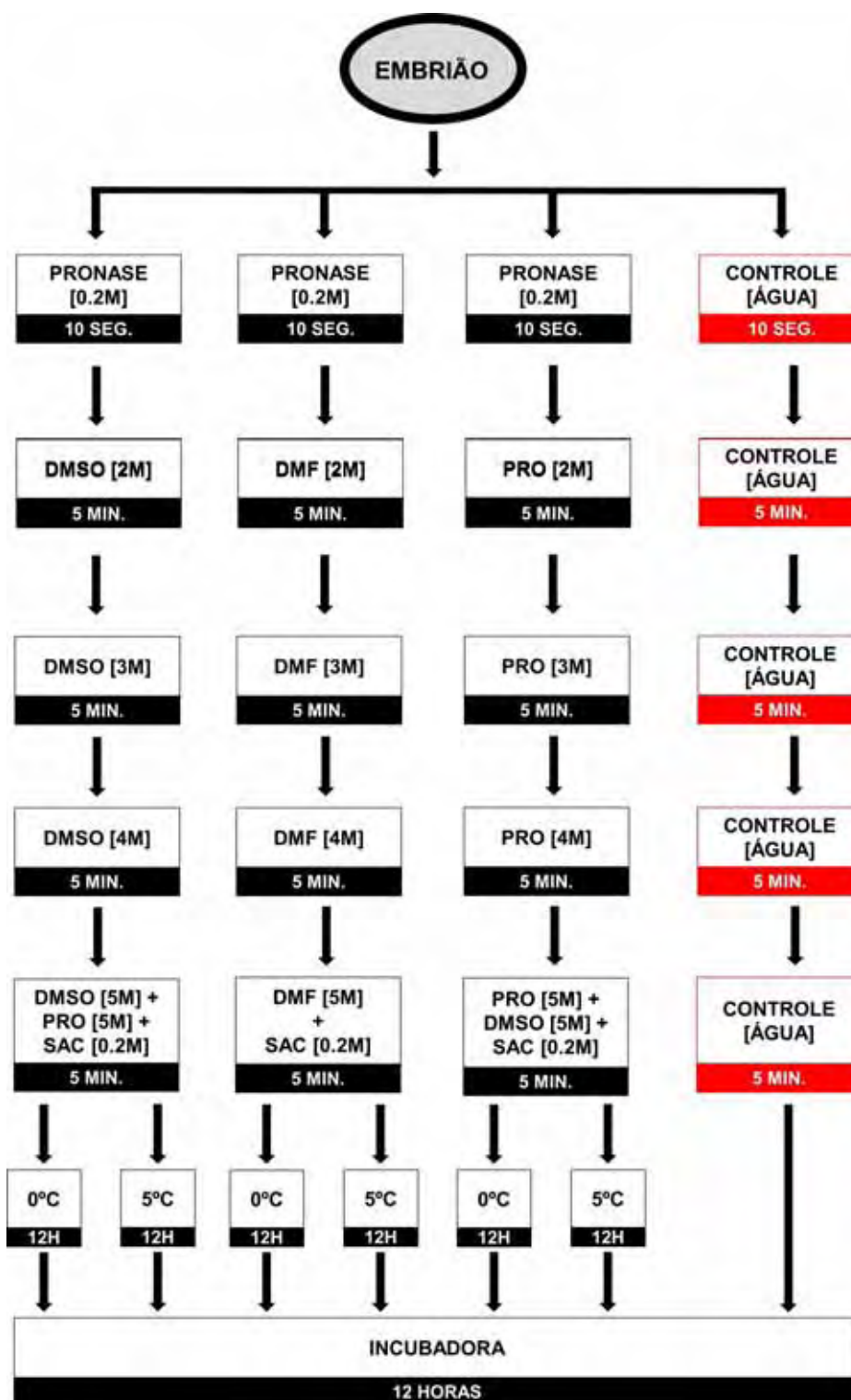
Legenda: Dimetil sulfóxido (DMSO), Propileno glicol (PROP) e Dimetil formamida (DMF), Glicerol (GLI) e Sacarose (SAC). **Fonte:** Elaboração do próprio autor.

2.3.5 Resfriamento

Os embriões foram acondicionados em incubadoras-PVC e expostos a três séries de soluções crioprotetoras (Figura 6). Cada teste foi inicializado com

a retirada do córion, através da enzima Pronase-E; após o qual, seguiam por banhos de crescente molaridade do crioprotetor principal e terminavam com uma associação de crioprotetores externo e interno(s), sendo utilizado como crioprotetores internos o dimetilsulfóxido (DMSO), propilenoglicol (PROP) e a dimetilformamida (DMF) e como crioprotetor externo a sacarose (SAC). Na última etapa, os embriões ainda embebidos na solução crioprotetora final, foram depositados em beakers de 250 ml contendo 150 ml da solução e armazenados, por um período de 12 h, em temperaturas de 0 e 5°C. Após o período de resfriamento, as amostras ainda nos beakers, foram aquecidas gradativamente até igualarem-se a temperatura ambiente, sendo posteriormente lavados em água corrente e acondicionados em tanques de fluxo contínuo de 1000 L, para continuar seu desenvolvimento embrionário por um período de doze horas.

Figura 6 - Organograma do teste de resfriamento de embriões.



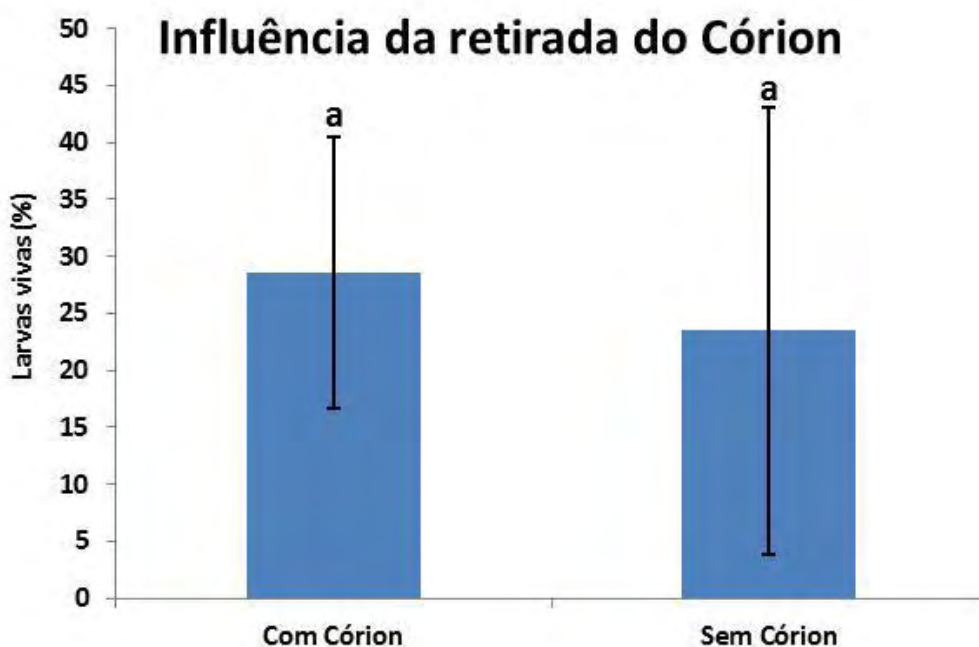
Legenda: Fase embrionária de organogênese com seis somitos e organogênese com vinte somitos: Dimetil sulfoxido (**DMSO**), Propileno glicol (**PROP**) e Dimetil formamida (**DMF**). **Fonte:** Elaboração do próprio autor.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Avaliação da retirada do Córion

A retirada da membrana coriônica, através da enzima Pronase-E, não demonstrou nenhuma influência significativa sobre o desenvolvimento embrionário de *Prochilodus lineatus* ($p=0,65$) (Figura 7).

Figura 7 - Gráfico das médias de larvas eclodidas em relação aos tratamentos de retirada da membrana coriônica.



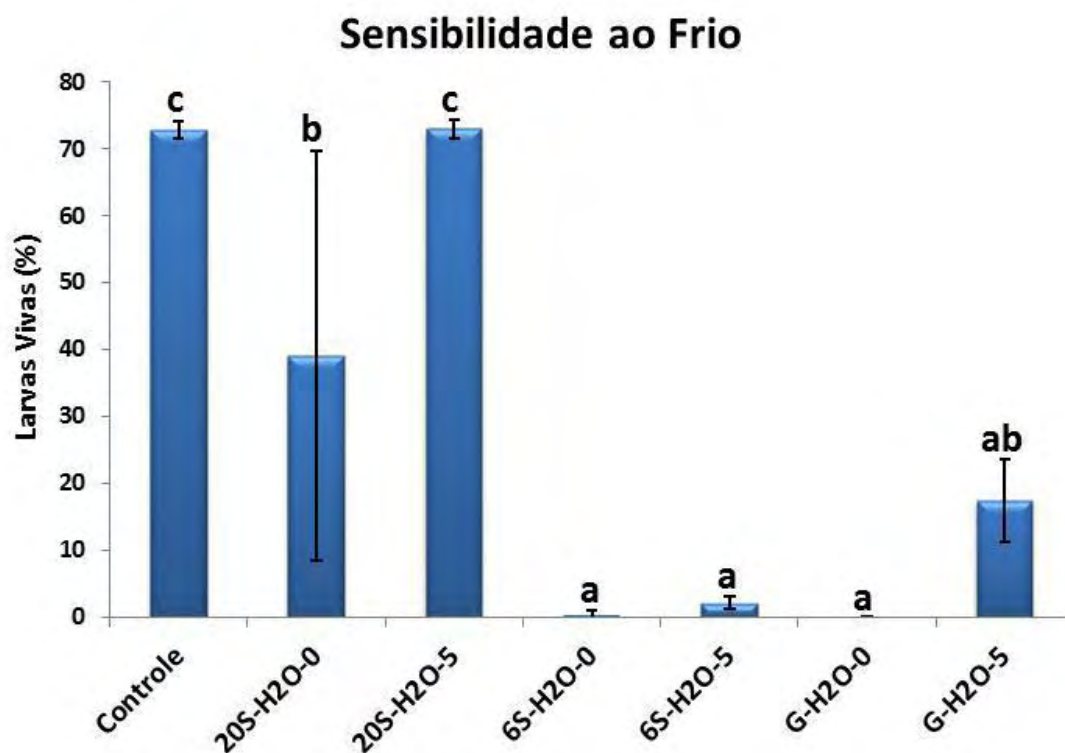
Legenda: “a” indica médias estatisticamente iguais. Total de embriões por amostra é de 139 ± 11 . **Fonte:** Elaboração do próprio autor.

2.4.2 Sensibilidade ao frio

Os embriões de *P. lineatus*, através de uma análise de variância ($\alpha = 0,05$), demonstraram uma alta significância estatística ao relacionarmos os estágios embrionários e as baixas temperaturas de armazenamento utilizadas no processo de resfriamento ($p < 0.0001$). Os estágios de Gastrulação e Organogênese com seis somitos foram uma altamente sensíveis à estocagem

sob baixas temperaturas (0°C e 5°C), não demonstrando nenhuma diferença significativa entre os tratamentos. Contudo, na fase embrionária de maior desenvolvimento (organogênese com vinte somitos) observou-se uma elevada resistência às baixas temperaturas. Por isso, quando expostos à temperatura de 0°C (Figura 8), sua taxa de sobrevivência foi superior aos das fases mais iniciais citadas e inferiores aos mantidos à temperatura de 5°C, que por sua vez, a média de larvas vivas foi estatisticamente iguais ao controle (desenvolvimento a temperatura ambiente) (Figura 9).

Figura 8 - Médias de larvas eclodidas expostas ao frio.



Legenda: G- gástrula; 6S- Organogênese com seis somitos; 20s- Organogênese com vinte somitos; 5- temperatura de 5°C, 0- temperatura em 0°C. “a”, “b” e “c” indicam médias estatisticamente iguais. Total de indivíduos por amostra é de 139 ± 11 . Índice de correção: Raiz quadrada de $Y + 0.5 - \text{SQRT}(Y + 0.5)$. **Fonte:** Elaboração do próprio autor.

Figura 9 - Médias de larvas eclodidas em relação aos tratamentos de sensibilidade ao frio por fase de desenvolvimento embrionário.



Legenda: G- gástrula; 6S- Organogênese com seis somitos; 20s- Organogênese com vinte somitos. "a", "b" e "c" indicam médias estatisticamente iguais. Total de indivíduos por amostra é de 139 ± 11 . (Índice de correção: Raiz quadrada de $Y + 0.5$ - $\text{SQRT}(Y + 0.5)$). **Fonte:** Elaboração do próprio autor.

2.4.3 Toxicidade

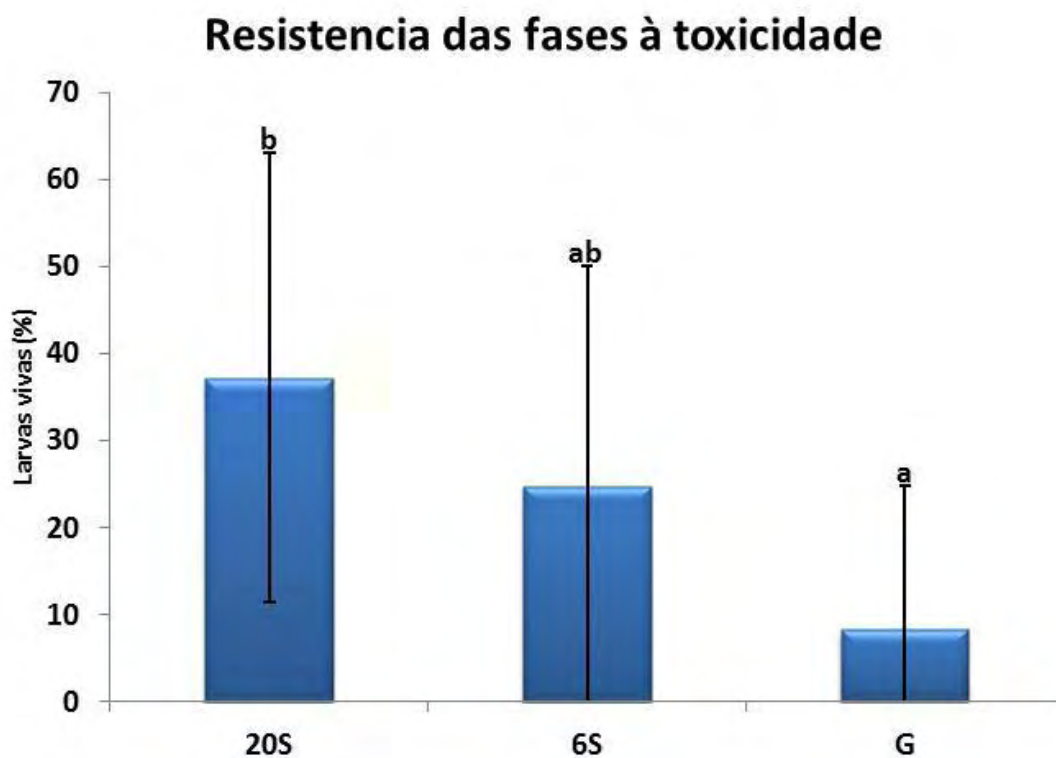
No experimento de toxicidade, foi observado uma alta significância entre a toxicidade dos crioprotetores e as fases de desenvolvimento embrionário ($p=0.0043$). Ao isolar as larvas vivas oriundas dos tratamentos, independentemente dos crioprotetores avaliados, observou-se que a toxicidade dos crioprotetores é inversamente proporcional ao tempo de desenvolvimento embrionário, sendo a fase de Organogênese com vinte somitos a mais resistente, seguida pela Organogênese com seis Somitos e Gastrulação (Figura 10).

Distinta ação tóxica foi produzido pelos crioprotetores. Ao isolarmos as soluções crioprotetoras sem a diferenciação das fases embrionárias, averiguamos que o GLI e a DMF possuem similar toxicidade, e foram mais

nocivos ao desenvolvimento dos embriões de *P. lineatus* do que os outros dois crioprotetores, DMSO e PROP, igualmente tóxicos ao organismo (Figura 11).

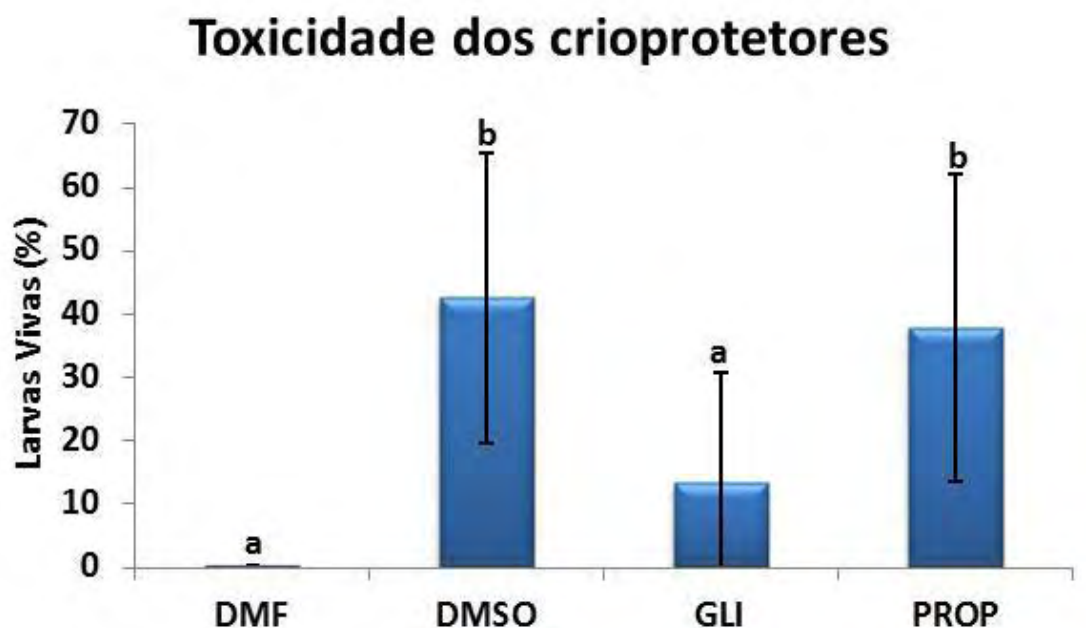
Ao avaliarmos os tratamentos como um todo, ou seja, as fases embrionárias associadas aos crioprotetores, averiguou-se que, com exceção da DMF, em que foi baixa a taxa de sobrevivência ao longo de todas as fases embrionárias. Associado a este fato, apenas na fase de Organogênese com 20 somitos, as médias foram estatisticamente iguais ao controle com a utilização do DMSO e PROP (Figura 12).

Figura 10 - Médias de larvas eclodidas em relação aos tratamentos de toxicidade por fase de desenvolvimento embrionário.



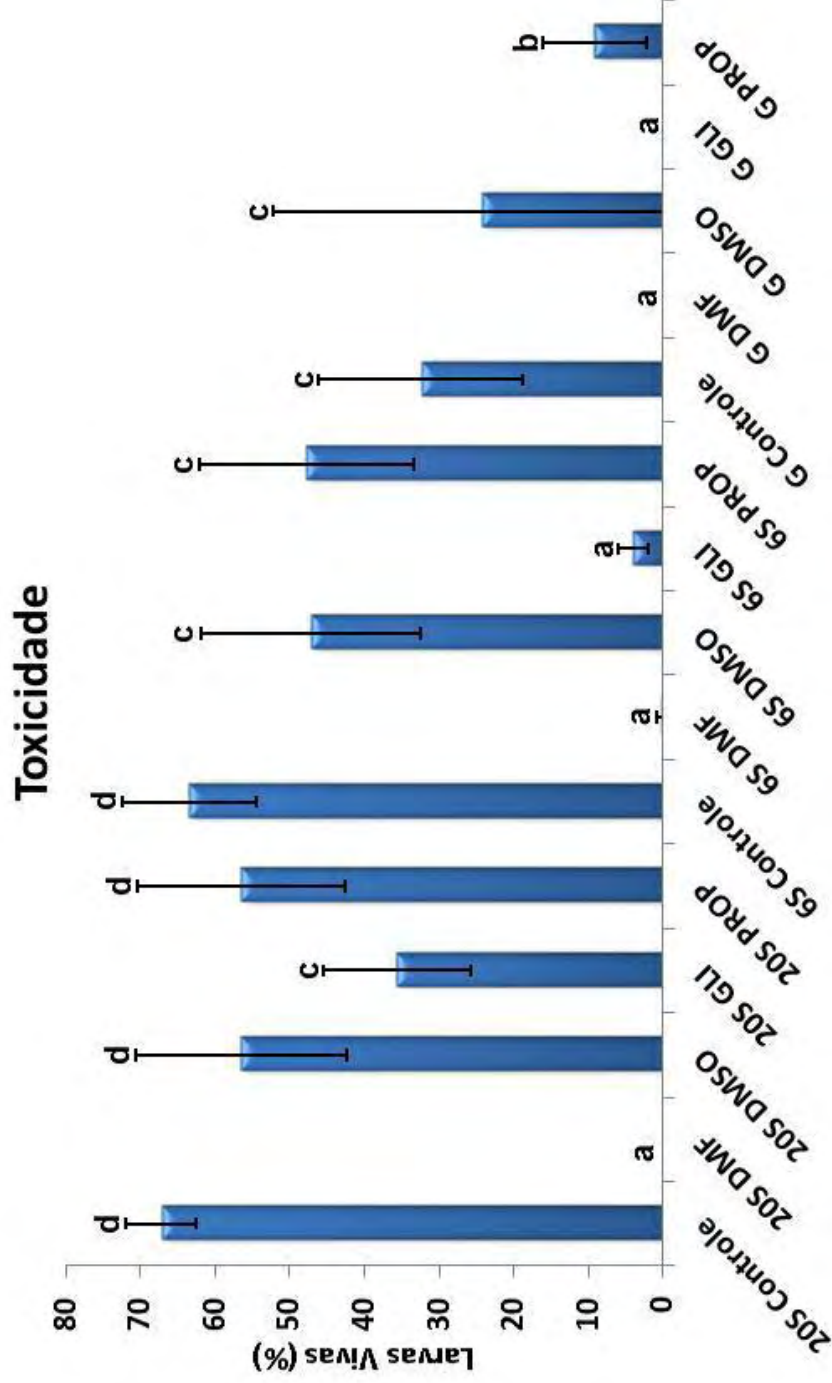
Legenda: G- gástrula; 6S- Organogênese com seis somitos; 20s- Organogênese com vinte somitos. "a" e "b" indicam médias estatisticamente iguais. Total de indivíduos por amostra é de 139 ± 11 . (Índice de correção: Raiz quadrada de $Y + 0.5$ - $\text{SQRT}(Y + 0.5)$). **Fonte:** Elaboração do próprio autor.

Figura 11 - Gráfico das médias de larvas eclodidas relacionado aos diferentes crioprotetores



Legenda: Dimetil sulfóxido (**DMSO**), Propileno glicol (**PROP**) e Dimetil formamida (**DMF**) e Glicerol (**GLI**). “a” e “b” indicam a comparação entre as médias geradas no teste de Scott-Knott, sendo que letras iguais indicam médias estatisticamente iguais. Total de indivíduos por amostra é de 139 ± 11 . (Índice de correção: Raiz quadrada de $Y + 0.5$ - $\text{SQRT} (Y + 0.5)$)). **Fonte:** Elaboração do próprio autor.

Figura 12 - Médias de larvas eclodidas em relação aos tratamentos de toxicidade.



Legenda: G- gástrula; 6S- Organogênese com seis somitos; 20s- Organogênese com vinte somitos. Dimetil sulfoxido (DMSO), Propileno glicol (PROP), Dimetil formamida (DMF) e Glicerol (GLI). "a", "b" "c" e "d" indicam médias estatisticamente iguais. Total de indivíduos por amostra é de 139 ± 11. (Índice de correção: Raiz quadrada de $Y + 0.5 - \text{SQRT} (Y + 0.5)$). **Fonte:** Elaboração do próprio autor.

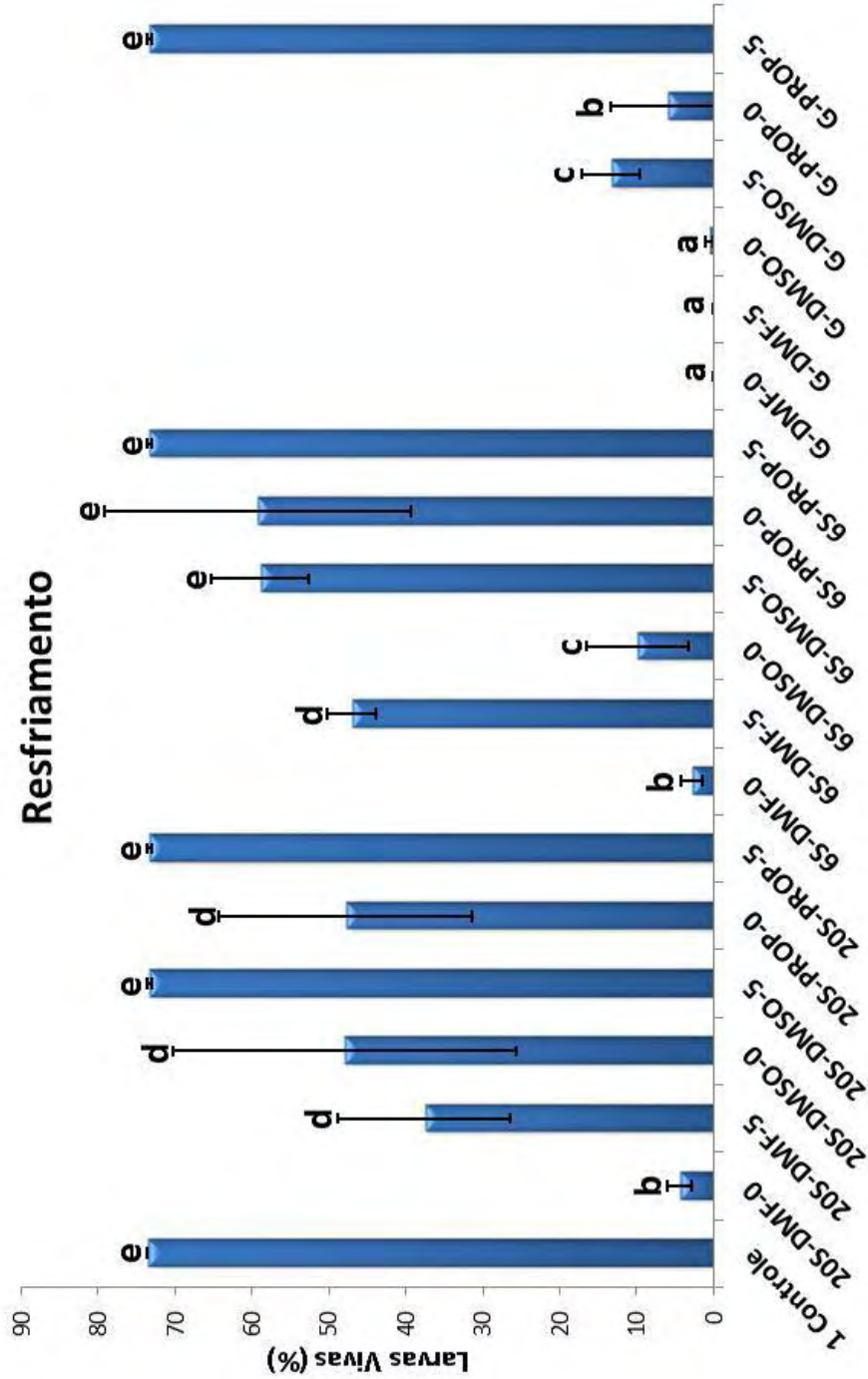
2.4.4 Resfriamento

Os tratamentos de resfriamento avaliados foram altamente significantes ($p < 0,0001$) ao serem submetidos a análise de variância ($\alpha=0,05$). Elevadas taxas médias de sobrevivência, foram obtidas nos tratamentos resfriados à 5°C, em todas as fases de desenvolvimento. O PROP não diferiu estatisticamente do controle em todas as fases de desenvolvimento, enquanto que o DMSO e a DMF apresentavam melhor resultado nas fases finais de desenvolvimento (Organogênese com seis somitos e vinte somitos) (Figura 13), quando comparado ao estágio de Gastrulação. No resfriamento à 0°C, todos os crioprotetores permitiram uma melhor taxa de sobrevivência embrionária conforme aumentava o tempo de desenvolvimento embrionário, ou seja, quanto mais desenvolvido o embrião maior sua resistência ao frio e aos crioprotetores. No estágio de organogênese com seis somitos, tratado com o propilenoglicol (PROP), ocorreu semelhança estatística com o controle (Figura 13).

Contudo, apesar das altas taxas de larvas vivas, quase que sua totalidade apresentaram deformidades que, possivelmente, inviabilizariam seu desenvolvimento normal (Figura 14).

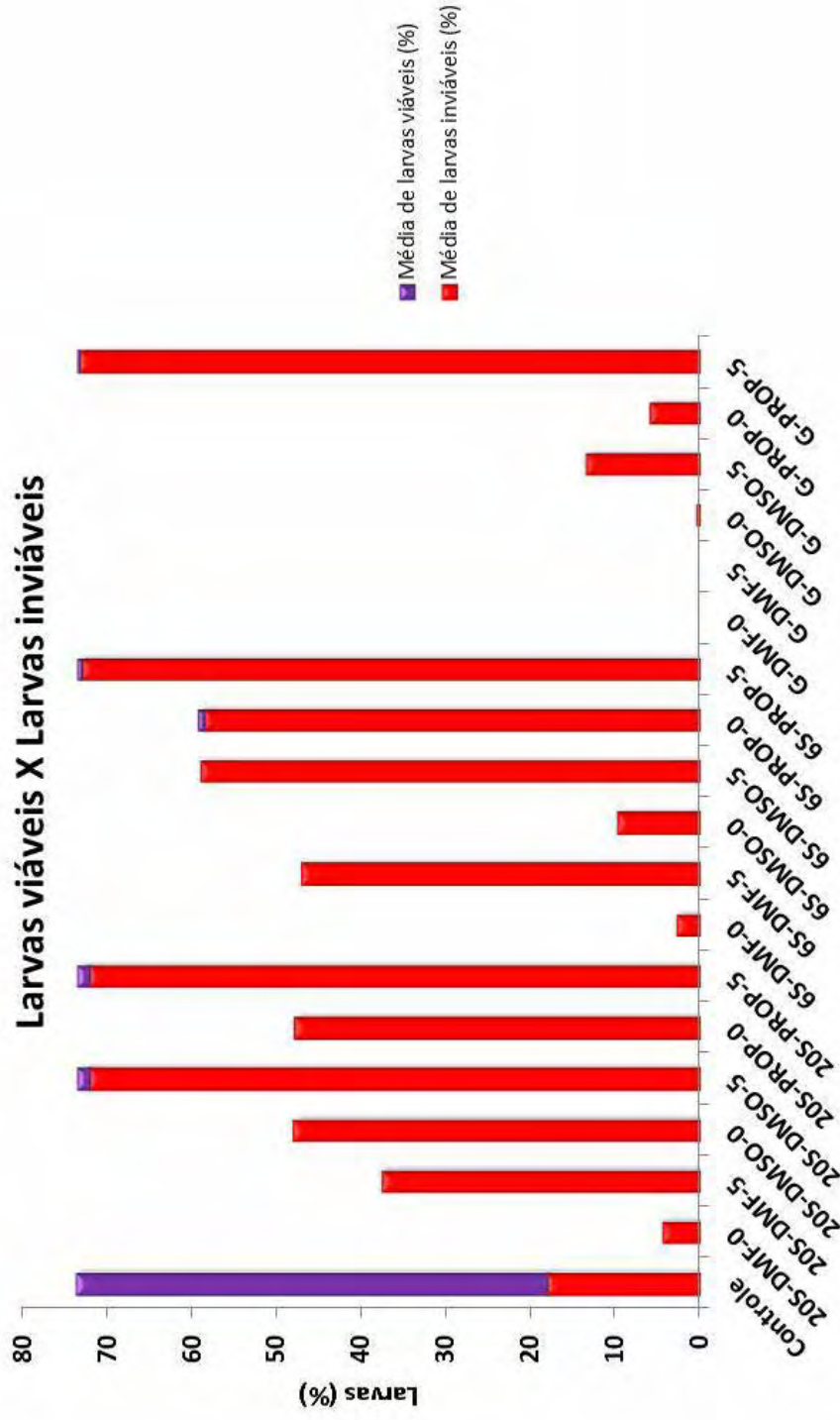
As análises morfológicas evidenciam inúmeras alterações estruturais graves pós crioconservação. Externamente, após o tratamento de resfriamento, as principais deformidades encontradas foram corpos de tamanho reduzido (Figura 15f) e/ou tortos (Figuras 15c e 15d) com nadadeiras embrionárias (Figura 16a) apresentando crescimento descontrolado formando massas celulares anormais (Figura 16b). Doze horas após a eclosão, estruturas como narinas (Figuras 17a, b e c), vesícula ótica (Figura 21b) e óptica (Figuras 18a e 19a) estão formadas em larvas de *Prochilodus lineatus*, contudo, após os processos de crioconservação essas estruturas apresentavam malformações (Figuras 17a, 18b, 19b, e 21b) e uma alta concentração de células com núcleo alterado, aumento de volume e uma alta reação a eosina (Figuras 19b, 20a, 20b e 21a); essas células, também se fizeram presentes, em alto número, no encéfalo (Figuras 20a-b e 21a) e na musculatura.

Figura 13 - Médias de larvas eclodidas em relação aos tratamentos de Resfriamento.



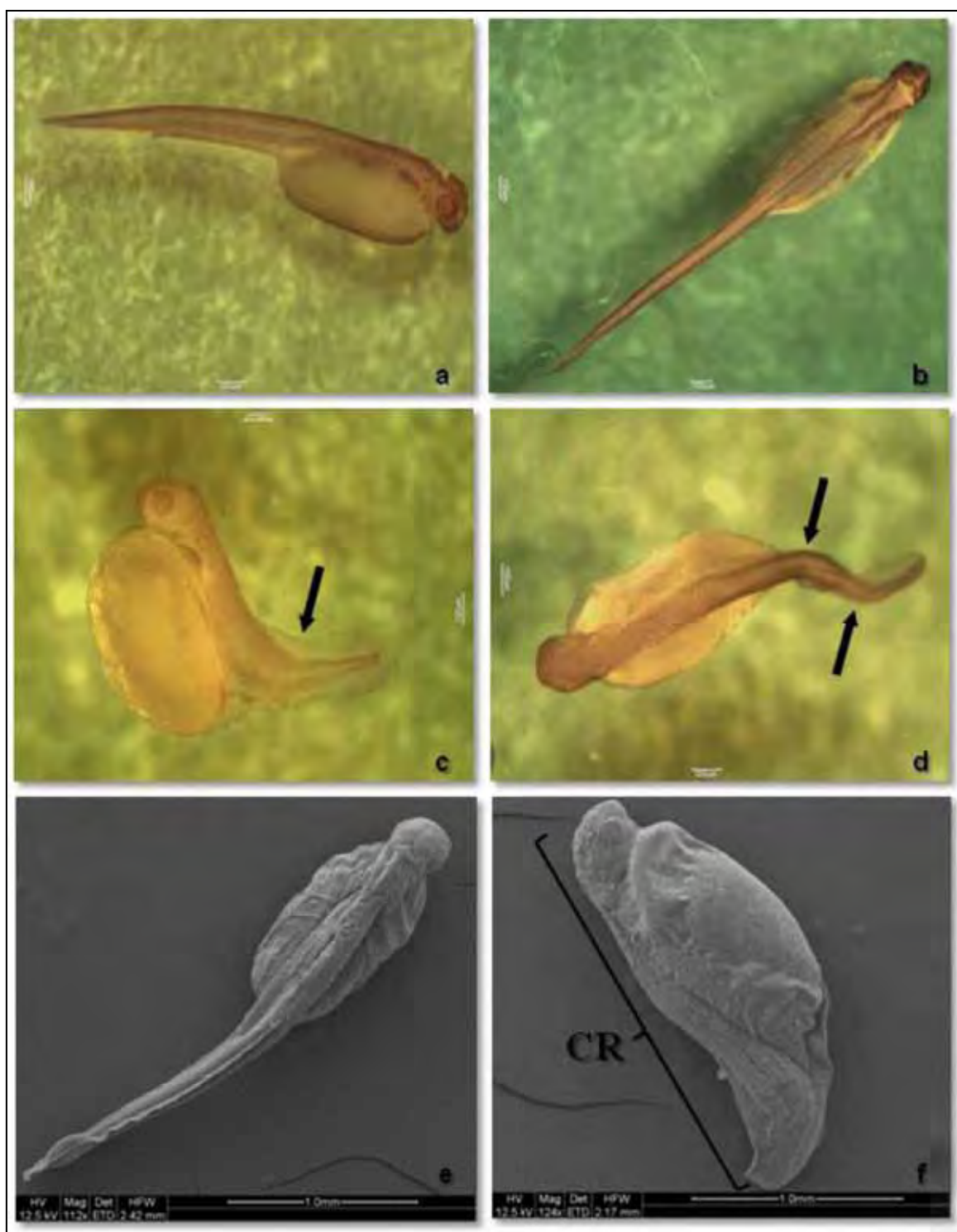
Legenda: G- gástrula; 6S- Organogênese com seis somitos; 20s- Organogênese com vinte somitos. Dimetil sulfoxido (DMSO), Propileno glicol (PROP), Dimetil formamida (DMF) e Glicerol (GLI); 5- temperatura de 5°C, 0- temperatura em 0°C. “a”, “b” e “d” indicam médias estatisticamente iguais. Total de indivíduos por amostra é de 139 ± 11. (Índice de correção: Raiz quadrada de Y + 0.5 - SQRT (Y + 0.5)). **Fonte:** Elaboração do próprio autor.

Figura 14 - Larvas inviáveis com relação ao percentual de larvas vivas dos tratamentos de resfriamento.



Legenda: G- gástrula; 6S- Organogênese com seis somitos; 20s- Organogênese com vinte somitos. Dimetil sulfoxido (DMSO), Propileno glicol (PROP), Dimetil formamida (DMF) e Glicerol (GLI); 5- temperatura de 5°C, 0- temperatura em 0°C Total de indivíduos por amostra é de 139 ± 11. (índice de correção: Raiz quadrada de Y + 0.5 - SQRT (Y + 0.5)). **Fonte:** Elaboração do próprio autor.

Figura 15 - Morfologia externa das larvas de *Prochilodus lineatus*.

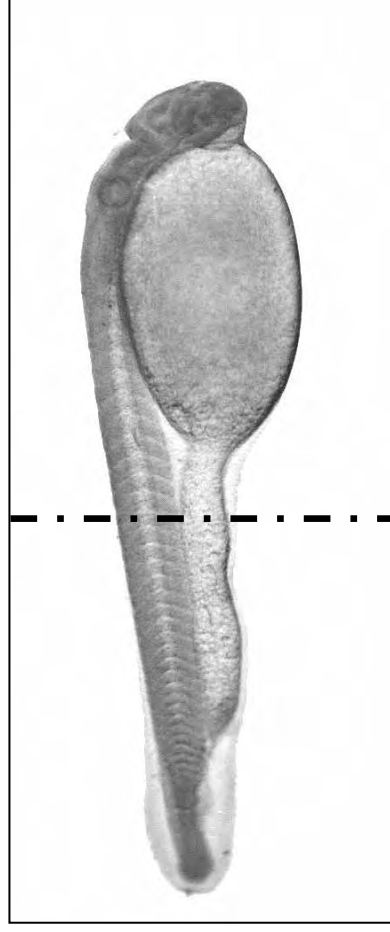


Legenda: A, B e E – Larvas controle; C, D e F – Larvas inviáveis. A a D Coloração de Hematoxilina, escala de 100µm; E e F MEV, escala de 1mm . CR – corpo reduzido; ➡ corpo torto. Fonte: Elaboração do próprio autor.

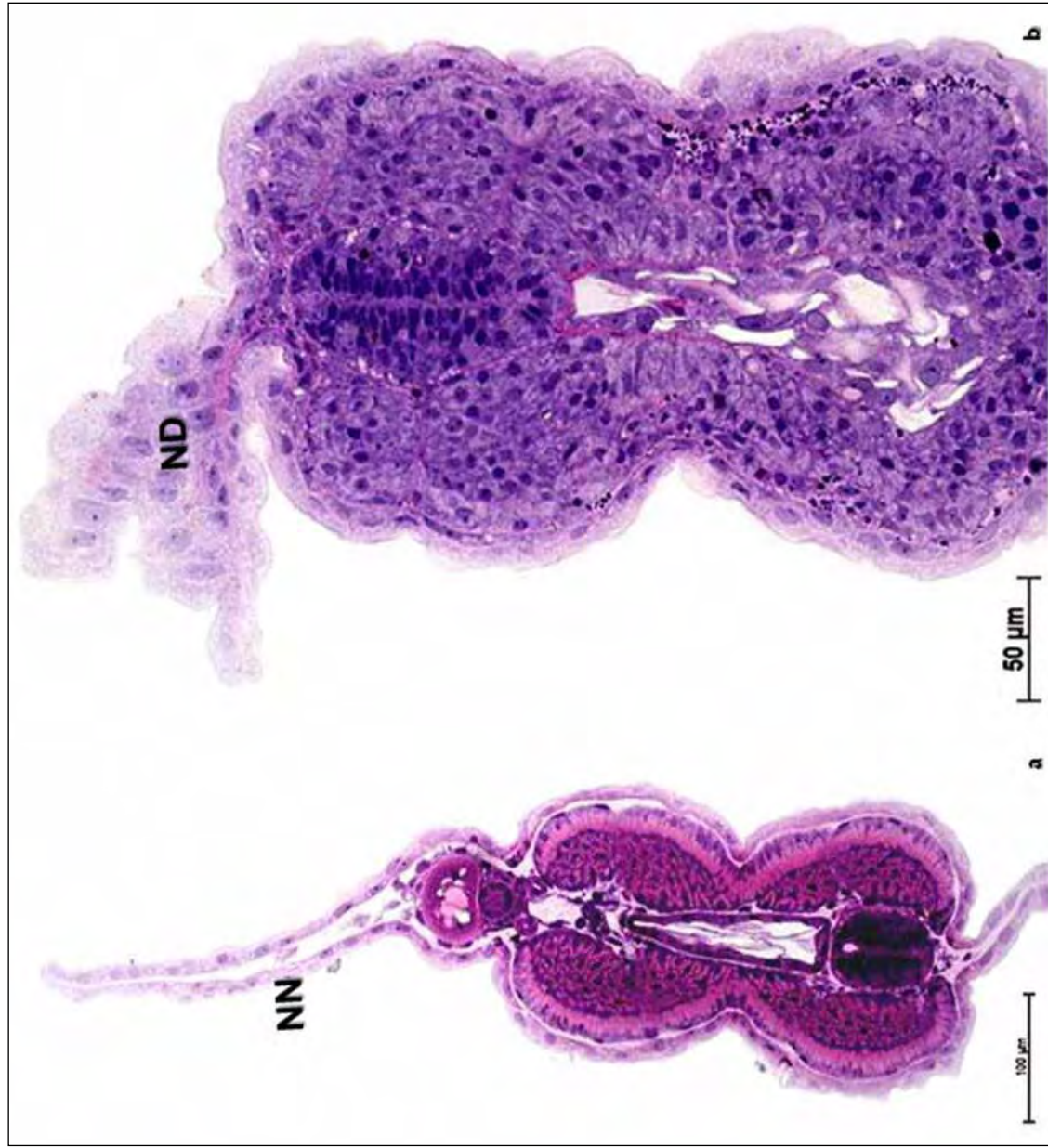
Figura 16 - Morfologia das larvas de *Prochilodus lineatus*.

Legenda: **A** e **B** – Corte Transversal da região caudal. **A** – Controle, corado em H.E., escala de 100µm; **B** – Larva inviável, corado em PAS, escala de 50µm. **NN** – nadadeira normal e **ND** – nadadeira defeituosa.

Figura – Corte transversal da região medial.



Fonte: Modificado de Ninhaus-Silveira, 2004

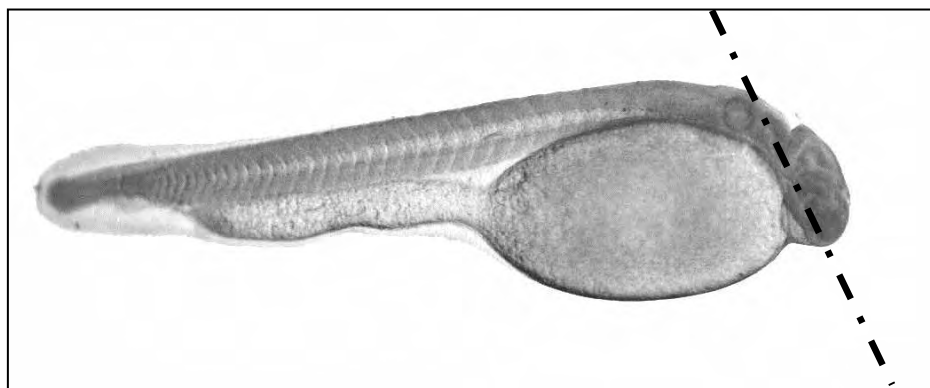


Fonte: Elaboração do próprio autor.

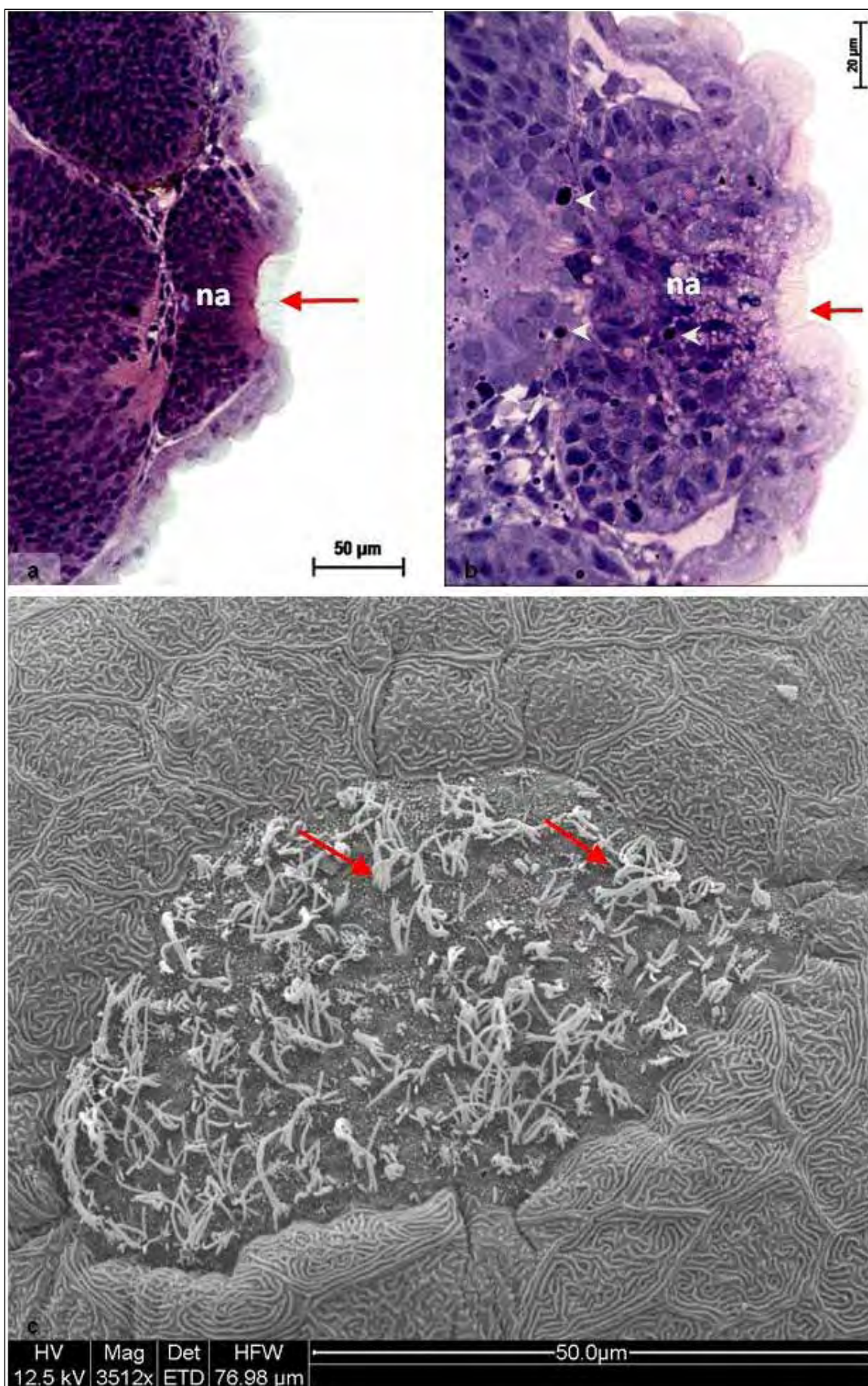
Figura 17 -- Morfologia das larvas de *Prochilodus lineatus*.

Legenda: **A, B e C**– Corte Transversal da região cranial (Narinas). **A** – Narina controle, corado em H.E., escala de 50µm; **B** – Narina com má-formação, corado em PAS, escala de 20µm; **C** - Narina controle, MEV, escala 50µm. **Seta vermelha** - cílios sensoriais; **na** – narina; **cabeça de seta** célula necrótica.

Corte transversal região cefálica



Fonte: Modificado de Ninhaus-Silveira, 2004.

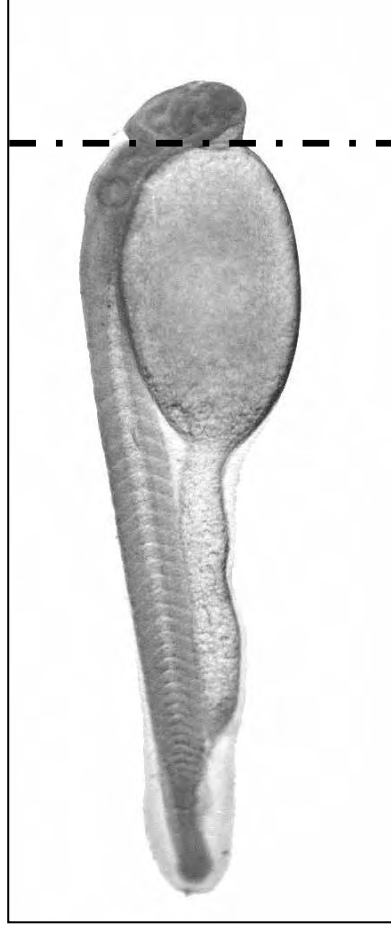


Fonte: Elaboração do próprio autor.

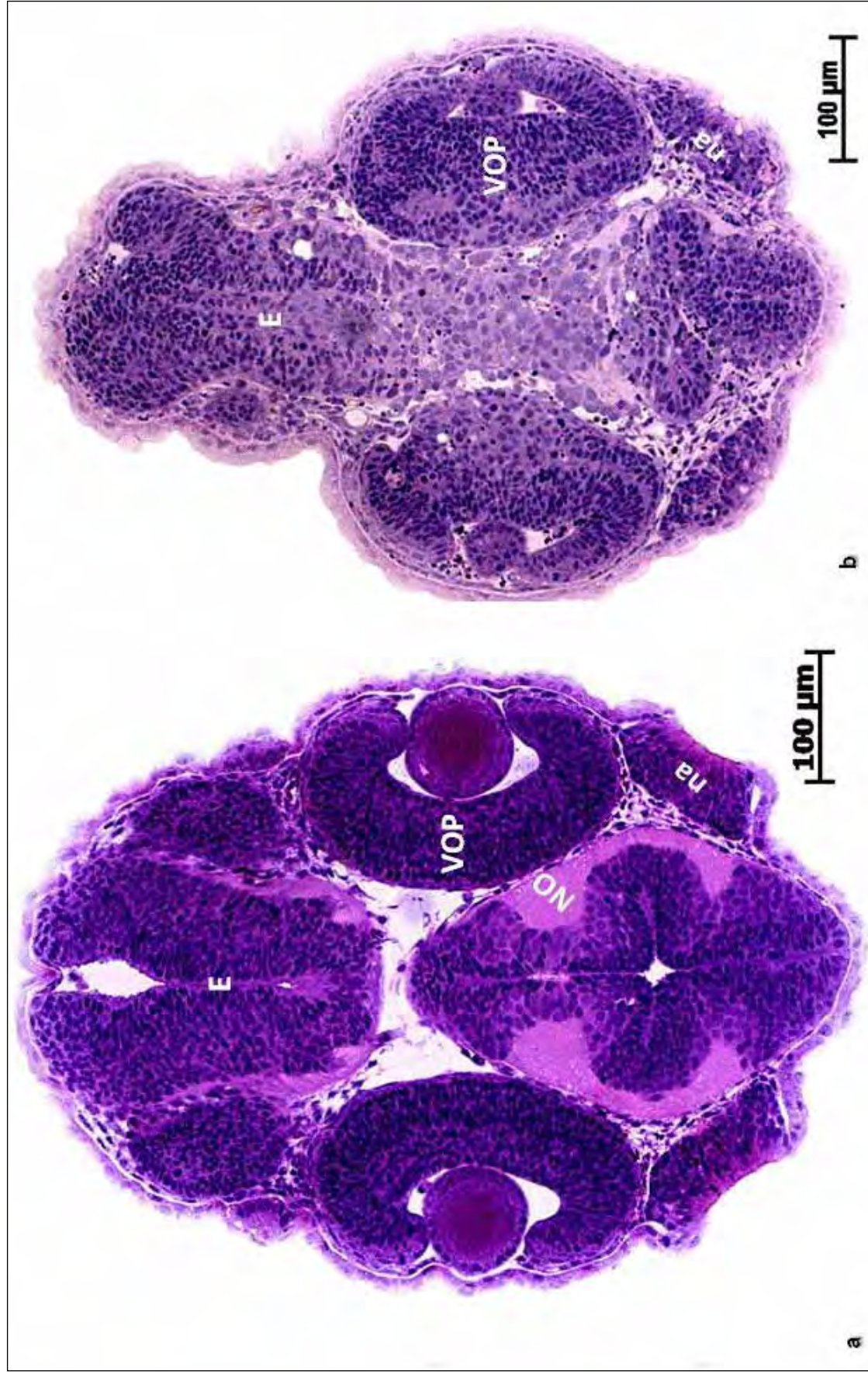
Figura 18 - Morfologia das larvas de *Prochilodus lineatus*.

Legenda: A e B– Corte Transversal da região cranial. A – Região cranial controle corado em H.E., escala de 100µm; B – Região cranial com má-formação, corado em HE, escala de 100µm. VOP – vesícula óptica; NO – nervo óptico; na – narina e E – encéfalo.

Corte transversal região cefálica



Fonte: Modificado de Ninhaus-Silveira, 2004.

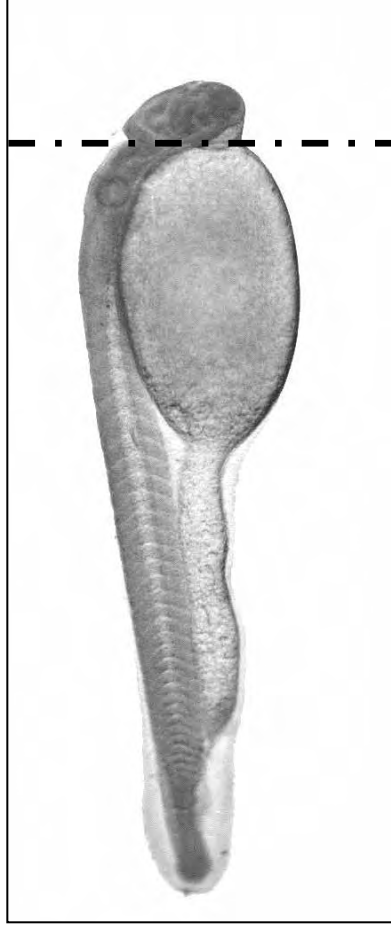


Fonte: Elaboração do próprio autor

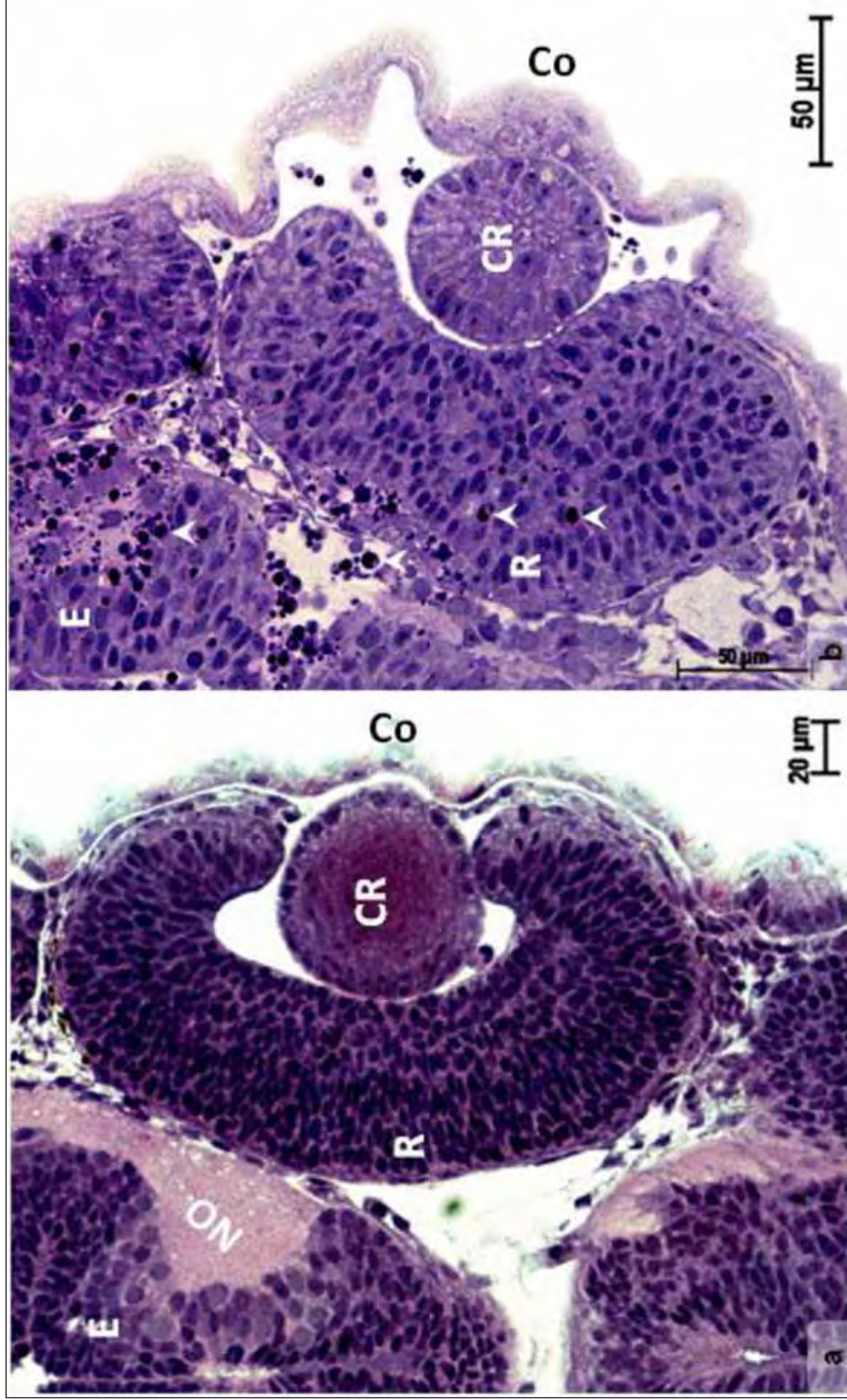
Figura 19 - Morfologia das larvas de *Prochilodus lineatus*.

Legenda: **A** e **B** – Corte Transversal da Vesícula Óptica. **A** – Vesícula Óptica corado em H.E., escala de 20µm; **B** – Vesícula Óptica com má-formação, corado em HE, escala de 50µm. **NO** – nervo óptico; **na** – narina; **E** – encéfalo; **Cabeça de seta** – células necróticas; **CR** – cristalino; **Co** – córnea e **R** – retina.

Corte transversal região cefálica



Fonte: Modificado de Ninhaus-Silveira, 2004.

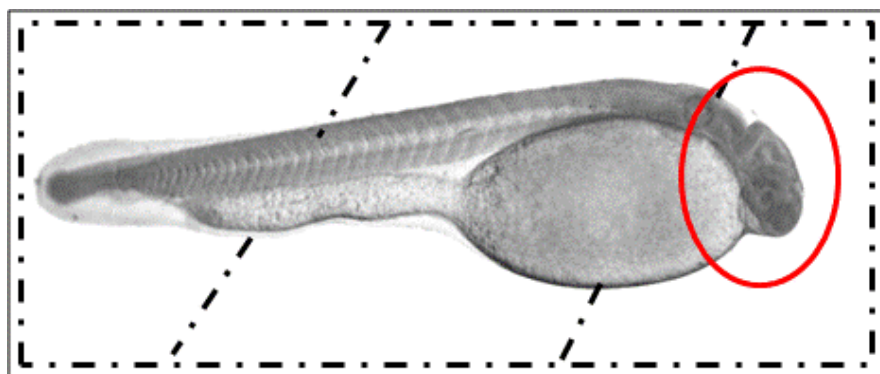


Fonte: Elaboração do próprio autor.

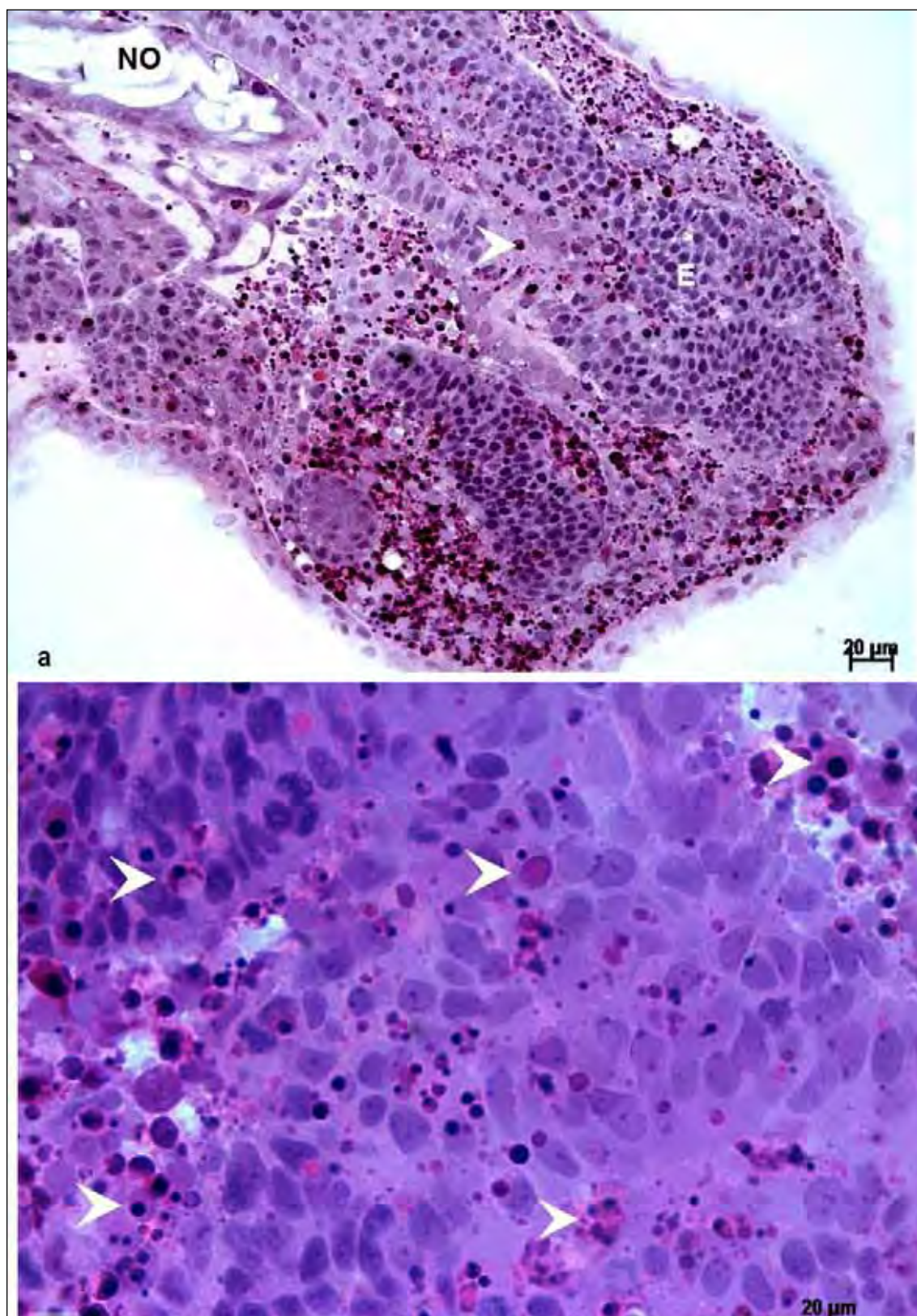
Figura 20 - Morfologia das larvas de *Prochilodus lineatus*.

Legenda: **A** e **B** – Corte Transversal da região cranial (Encéfalo). **A** – Região cranial, corado em H.E., escala de 20µm; **B** – Encéfalo, corado em H.E, escala de 20µm. **NO** – notocorda; **Cabeça de seta** – células necróticas (altamente corada com eosina) e **E** – encéfalo;

Corte longitudinal – visão da região cranial.



Fonte: Modificado de Ninhaus-Silveira, 2004.

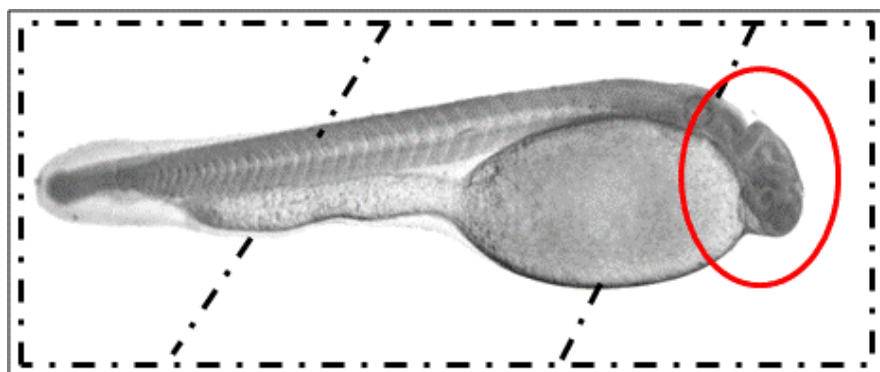


Fonte: Elaboração do próprio autor.

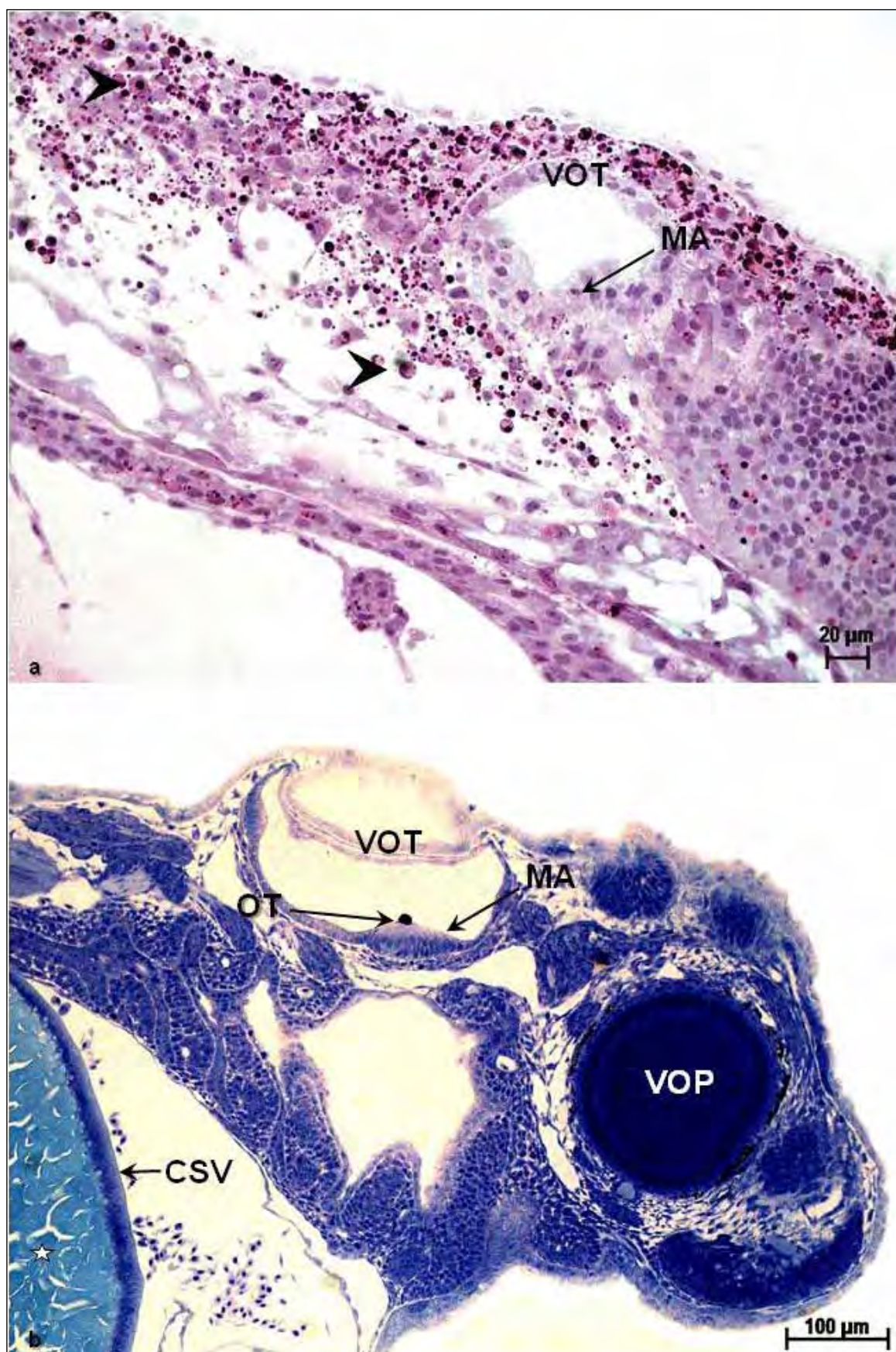
Figura 21 - Morfologia das larvas de *Prochilodus lineatus*.

Legenda: **A e B** – Corte Transversal da região cranial (Vesícula ótica). **A** – Vesícula ótica (má-formação), corado em H.E., escala de 20 μ m; **B** – Região cranial (controle), corado em Azul de toluidina, escala de 100 μ m. **Cabeça de seta** – células necróticas (altamente corada com eosina); **VOT** – Vesícula ótica; **MA** – mácula; **OT** – otólito; **VOP** – Vesícula Ótica e **CSV** – camada sincicial de vitelo.

Corte longitudinal – visão da região cranial.



Fonte: Modificado de Ninhaus-Silveira, 2004.



Fonte: Elaboração do próprio autor.

O vitelo foi entre as estrutura a que mais apresentou deformidades, sofrendo um processo de retração (Figuras 22a, 22b e 23a) e alteração morfológica de seus glóbulos (Figura 27a). Sua retração levou, por varias vezes, a perda de contato entre o vitelo, a camada sincicial do vitelo (Periblasto) (Figura 23a) e o embrião, gerando desta forma, espaços entre as membranas (Figura 23a).

O processo de crenação (redução de volume) causou, em alguns casos, a ruptura da membrana vitelina (Figura 23c).

A camada sincicial de vitelo (Periblasto - CSV) apresentou lacunas anormais em sua estrutura (Figura 23d) e através da análise ultraestrutural, pode-se observar que a CSV apresentou-se mais elétron densa (Figura 27d) com um aspecto desorganizado e com a presença de núcleos com a cromatina alterada e/ou destruídos (Figura 27b); além disso, foram observados glóbulos de vitelo com morfologia normal (Figura 27a), alguns com coloração e consistência alterada e outros desintegrados (Figura 27a).

A notocorda apresentou um formato sinuoso (Figura 28) e a membrana basal que reveste esta estrutura, e que reagiu com a coloração de PAS nas larvas controle (Figuras 24a e 24b), não detinha uma uniformidade aparente ao longo da estrutura (Figuras 24d e 26b).

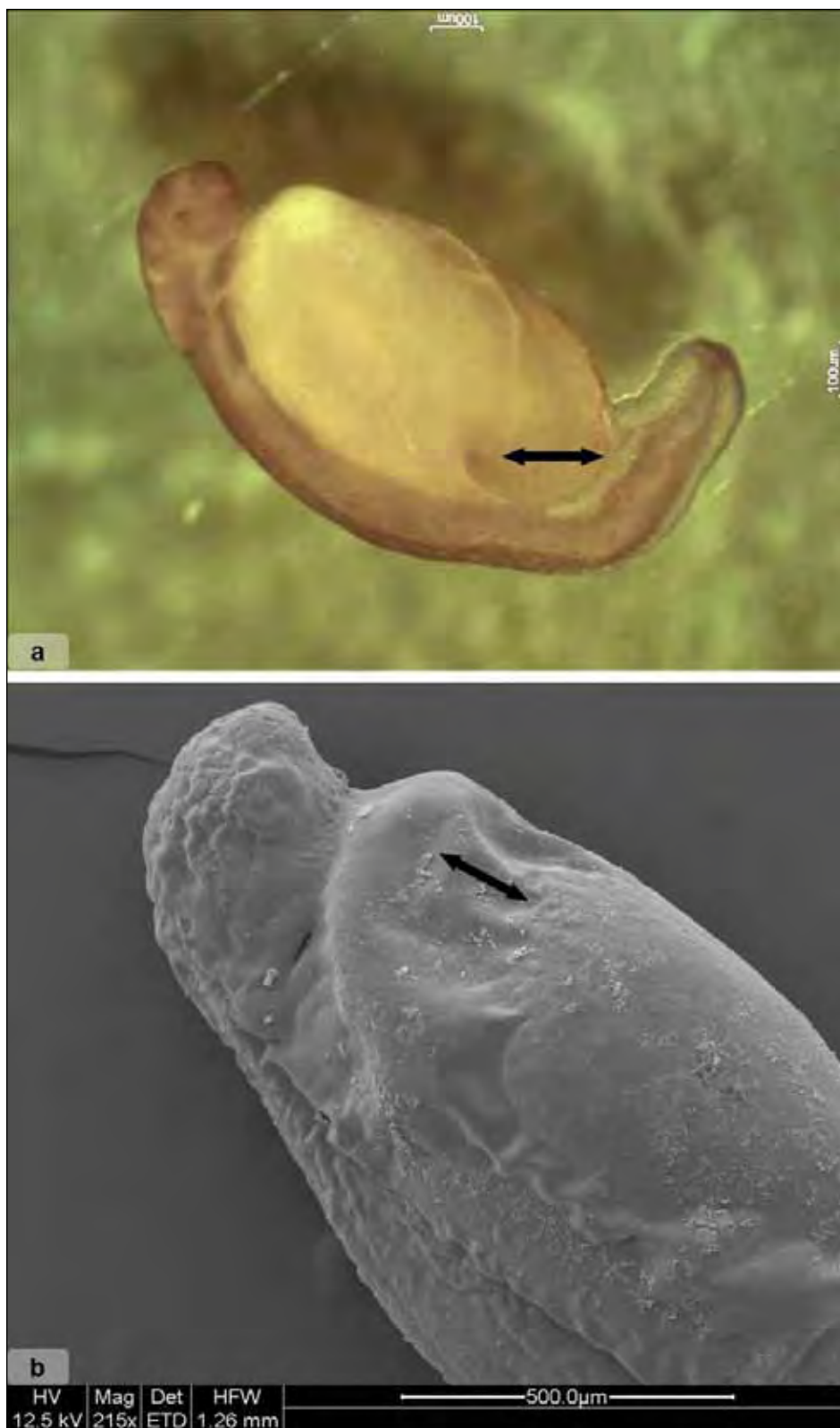
Na formação da musculatura (Figuras 25a e 24c) muitas regiões apresentavam células se fundindo de forma desalinhada (Figuras 24c e 25b) o que culminou na formação de somitos desalinhados (Figura 25b).

As estruturas como somitos e tubo neural, a endoderme e a ectoderme apresentaram núcleo e mitocôndrias íntegras (Figuras 27e - f).

O corte transversal da larva permitiu verificar a existência de uma camada que reage ao PAS e que une dois tipos de musculatura larval (Figuras 24b e 26a), contudo, após os tratamentos de resfriamento, essas musculaturas não apresentavam uma divisão clara. (Figuras 24d e 26b).

Figura 22 - Morfologia externa das larvas de *Prochilodus lineatus*.

Legenda: **A** e **B** – Larva com retração no vitelo, Coloração de Hematoxilina **A** - escala de 100µm, **B** – escala 500µm MEV. **Seta dupla** - retração do vitelo.

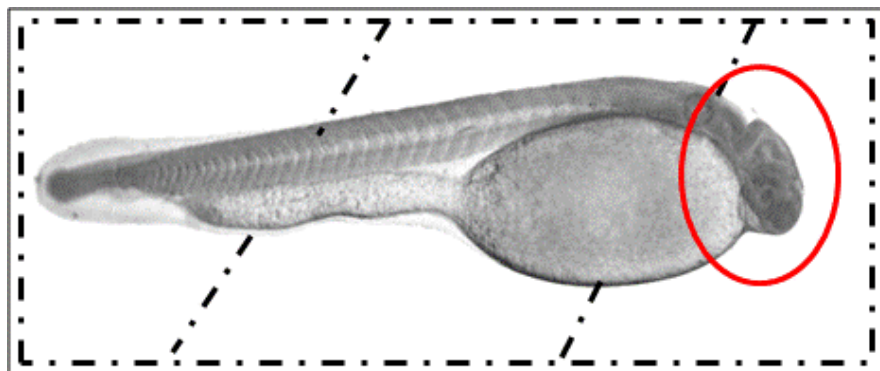


Fonte: Elaboração do próprio autor.

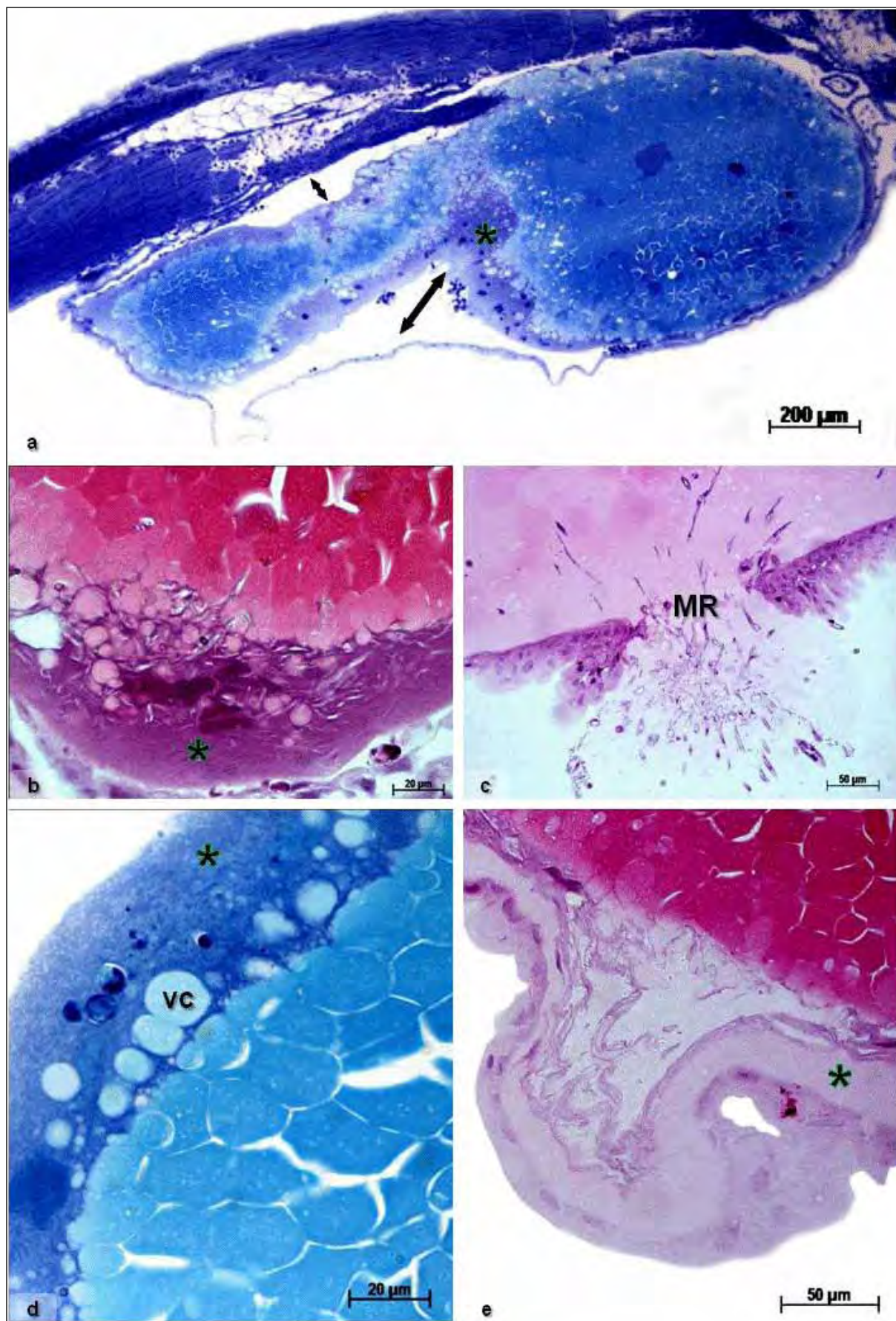
Figura 23 - Morfologia das larvas de *Prochilodus lineatus*.

Legenda: **A a D** – Corte Transversal da região mediana (Vitelo). **A** – Vitelo, corado em azul de toluidina., escala de 200µm; **B** – Camada sincicial de vitelo, corado em H.E, escala de 20µm; **C** – Rompimento da Membrana vitelina, coloração H.E., escala 20µm; **D** – Camada sincicial de vitelo, corado em azul de toluidina, escala 20µm; **E** - Camada sincicial de vitelo, corado em PAS; escala 50µm. **NO** – notocorda; **Dupla seta** – retração do vitelo e **E** – encéfalo; **Asterisco** - Camada sincicial de vitelo; **MR** – Membrana rompida; **VC** – vacúolo;

Corte longitudinal – visão da região cranial.



Fonte: Modificado de Ninhaus-Silveira, 2004.

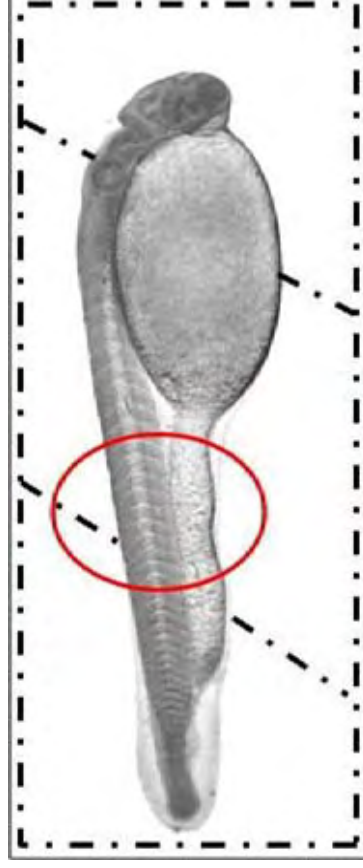


Fonte: Elaboração do próprio autor.

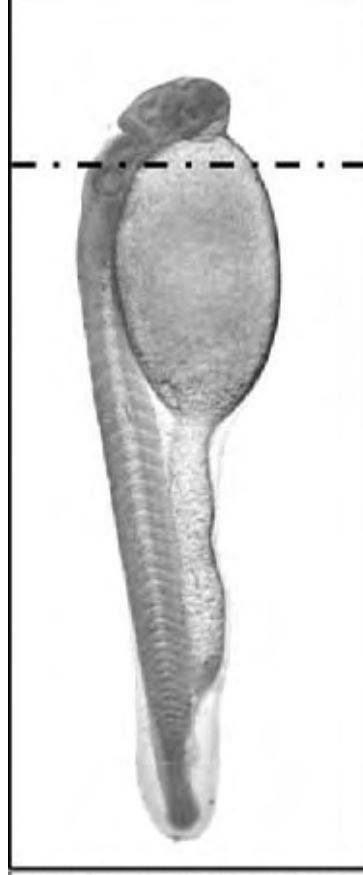
Figura 24 - Morfologia das larvas de *Prochilodus lineatus*.

Legenda: **A e C** – Corte Longitudinal da região mediana (miômeros); **B e D** – Corte Transversal da região cranial. **A** – Miômeros, corado em PAS., escala de 50µm; **B** – Notocorda, corado em PAS, escala de 50µm; **C** – Miômeros, corado H.E., escala 50µm; **D** – Notocorda corado em PAS, escala 50µm; **E** - Camada sincicial de vitelo, corado em PAS; escala 50µm. **NO** – notocorda; **LB** – lâmina basal; **S** – somito; **M** – miosepto; **MB** – musculatura branca; **MV** – musculatura vermelha; ● → - mioblasto.

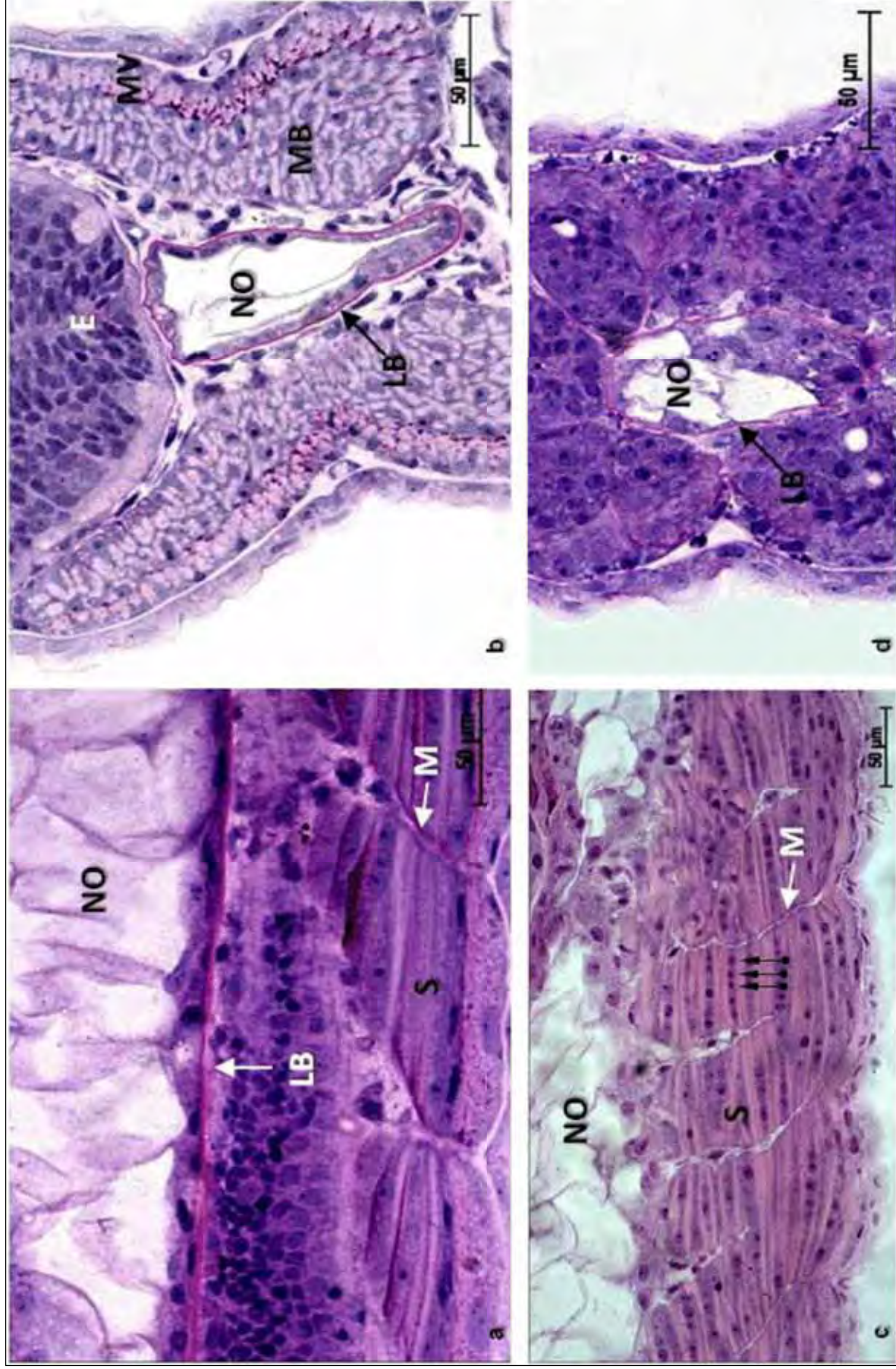
Corte longitudinal – visão da região mediana



Corte transversal – visão da região cranial.



Fonte: Modificado de Ninhaus-Silveira, 2004.

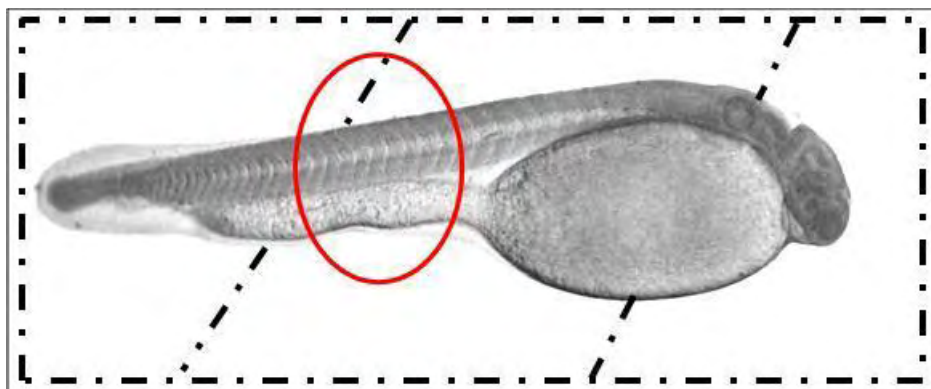


Fonte: Elaboração do próprio autor.

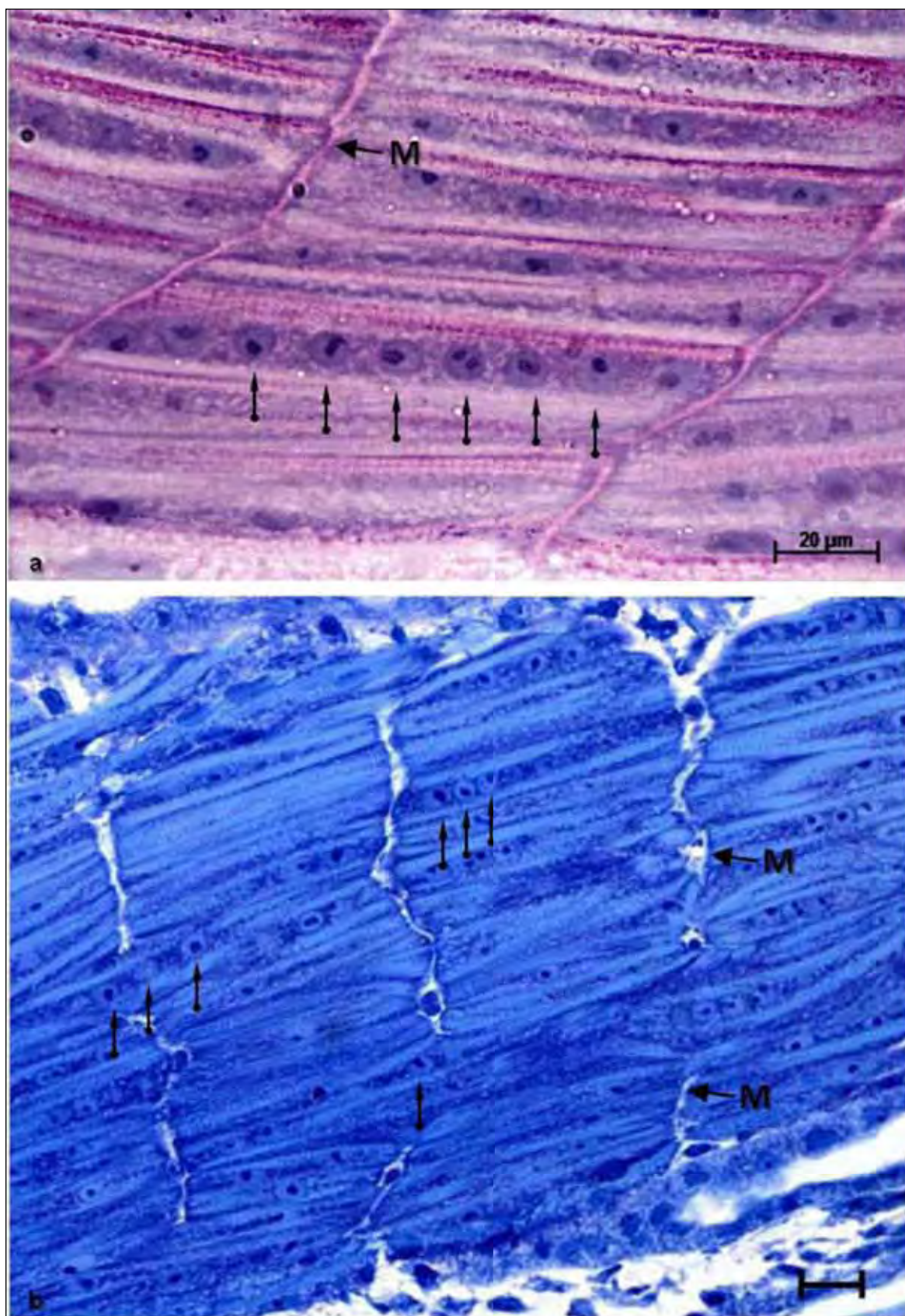
Figura 25 - Morfologia das larvas de *Prochilodus lineatus*.

Legenda: A e B – Corte Longitudinal da região mediana (miômeros); A – Miômeros, corado em PAS., escala de 20µm; B – Miômeros, corado em Azul de toluidina (má-formação), escala de 20µm. M – miosepto; ● → - mioblasto.

Corte longitudinal – visão da região mediana



Fonte: Modificado de Ninhaus-Silveira, 2004.

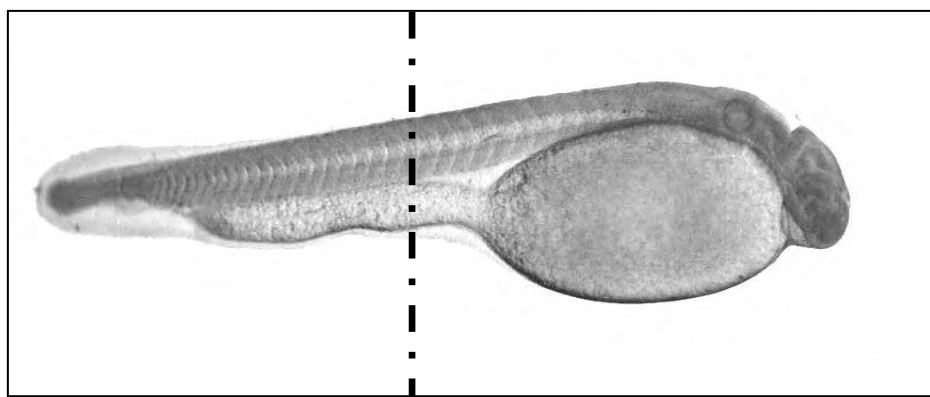


Fonte: Elaboração do próprio autor.

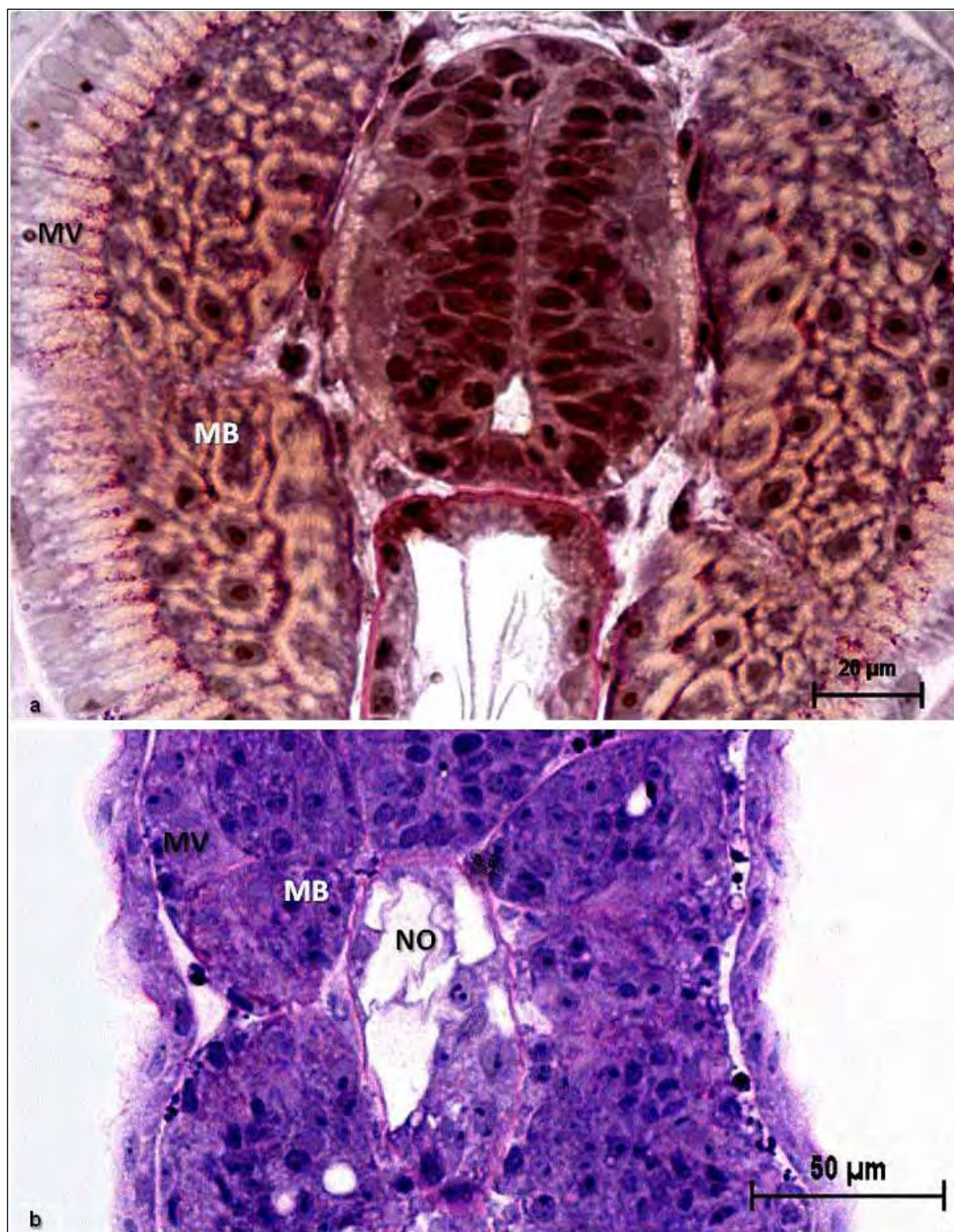
Figura 26 - Morfologia das larvas de *Prochilodus lineatus*.

Legenda: **A** e **B** – Corte transversal da região mediana (Musculatura); **A** – Musculatura controle, corado em Metanil Yellow., escala de 20 μ m; **B** – Musculatura, corado em PAS (má-formação), escala de 50 μ m. **MB** – musculatura branca; **MV** – musculatura vermelha; **NO** – notocorda;

Corte Transversal – visão da região mediana



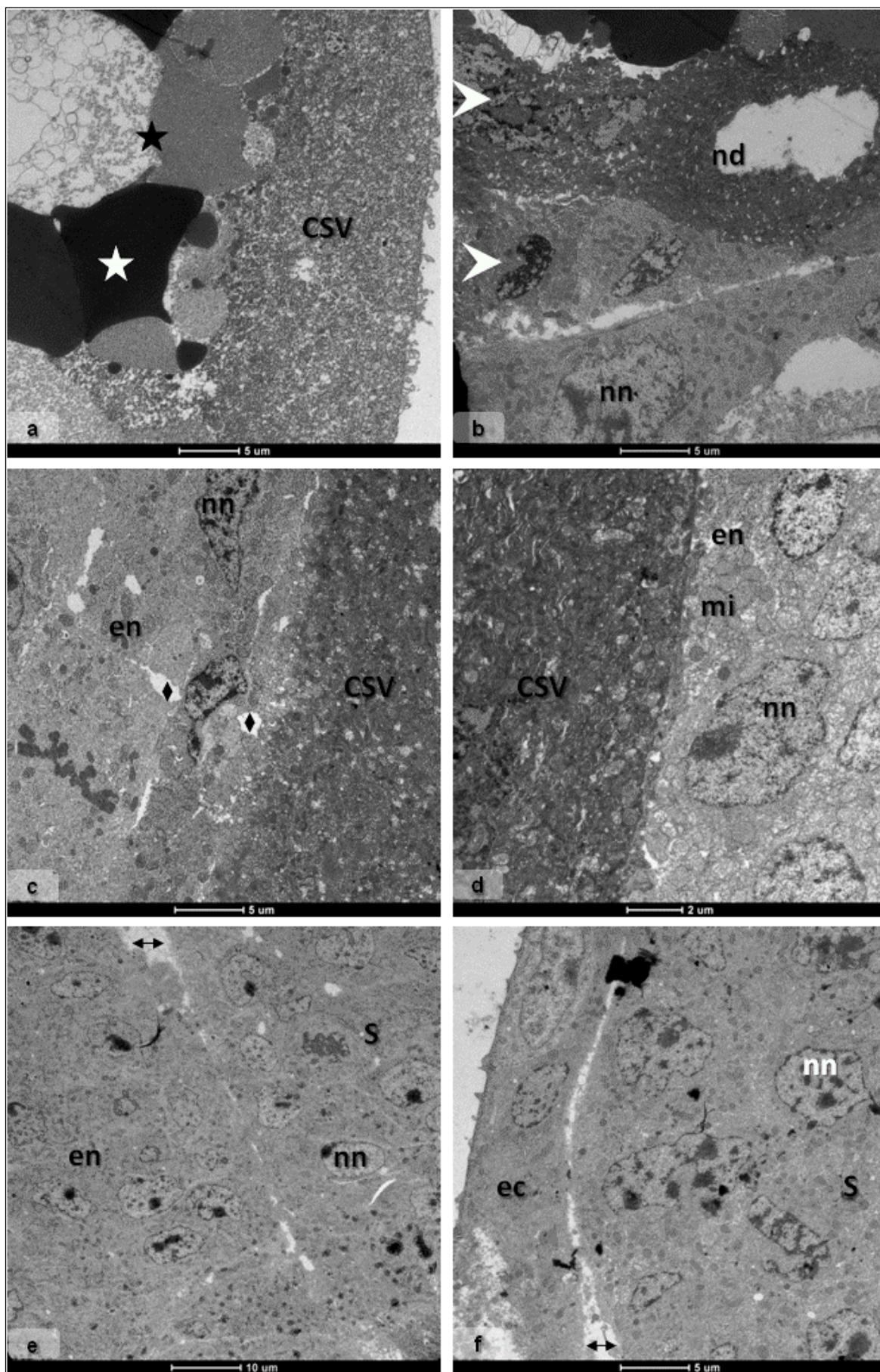
Fonte: Modificado de Ninhaus-Silveira, 2004.



Fonte: Elaboração do próprio autor

Figura 27 – Microscopia eletrônica de transmissão em embriões criopreservados de *Prochilodus lineatus*.

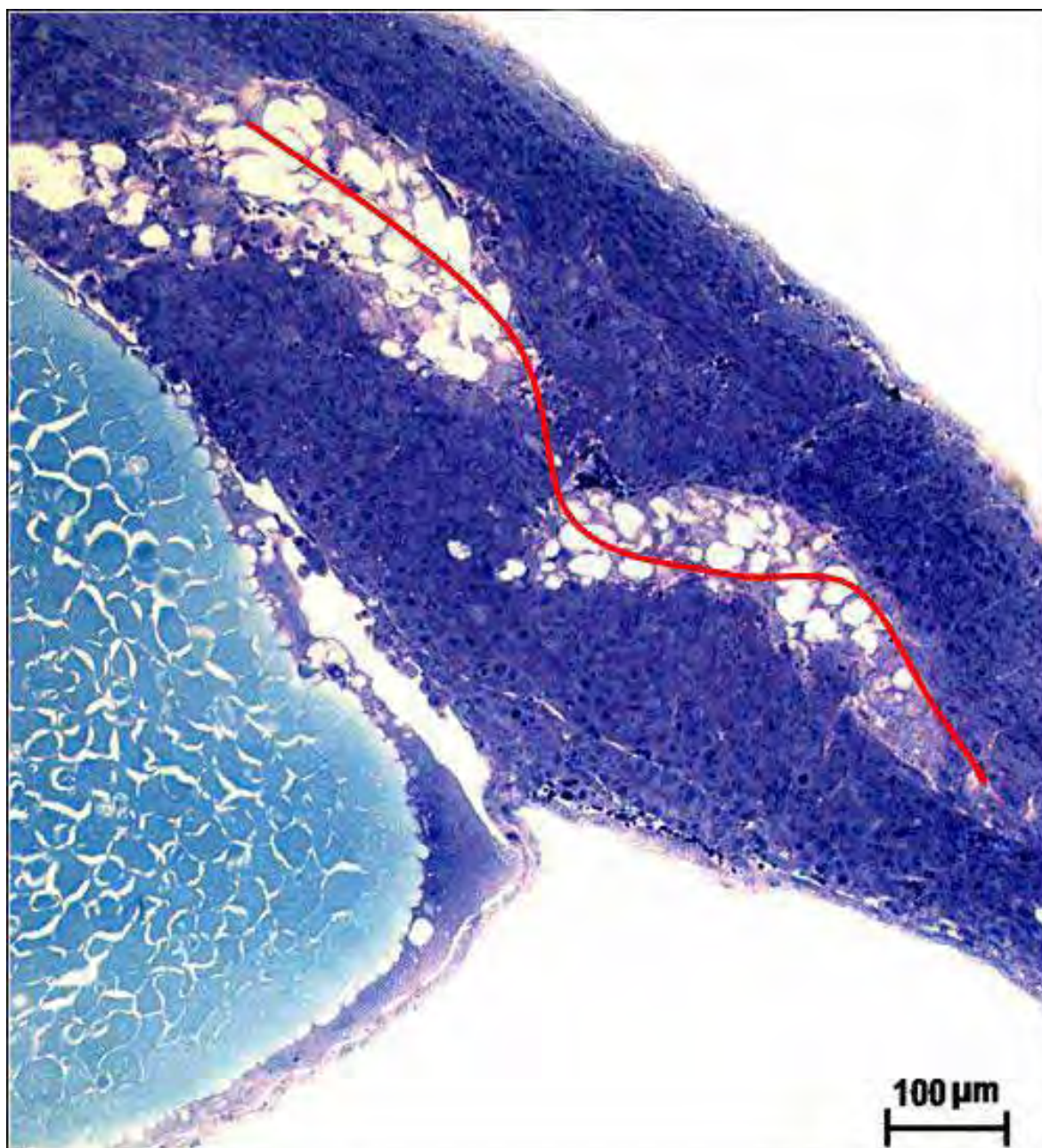
Legenda: **A, B, C e F** – escala de 5 μ m; **D** – escala de 2 μ m; **E** – escala de 10 μ m. **CSV** – camada sincicial de vitelo; **Estrela preta** – glóbulo de vitelo degradado; **Estrela branca** – glóbulo de vitelo normal; **Cabeça de seta** – núcleo com cromatina alterada; **nn** – núcleo normal; **nd** – núcleo destruído; **en** – endoderme; **mi** – mitocôndria; **S** – somitos; **seta dupla** – espaço entre as células.



Fonte: Elaboração do próprio autor.

Figura 28- Morfologia dos embriões resfriados de *Prochilodus lineatus*.

Legenda: Larva com 12 horas pós-eclosão, corada com azul de toluidina, escala 100 µm.
Linha sinuosa vermelha – notocorda apresentando curvatura.



Fonte: Elaboração do próprio autor.

2.5 DISCUSSÃO

O córion é uma membrana proteica que envolve e protege os embriões de peixes contra choques mecânicos; contudo, esta membrana é a primeira barreira de resistência à difusão dos crioprotetores e da água no processo de criopreservação, junto a isso, existe uma camada fluídica entre o embrião e o córion que ocupa, no embrião de zebra fish, três quartos de seu diâmetro (HARVEY et al., 1983), e por isso, alguns autores utilizam metodologias para promover a sua retirada ou a sua permeabilização (CABRITA et al., 2002; SEREAN et al., 2005; ZANG; RAWSON., 1996). Nossos resultados foram similares aos obtidos por Ninhaus-Silveira et al., (2008) com os embriões de curimatá e Liu et al. (2000), que ao extraírem o córion através de soluções enzimáticas, não observaram danos ao desenvolvimento embrionário (ROBLES et al., 2009; SEREAN et al., 2005). Entretanto, Cabrita et al. (2003) chama a atenção que apesar da digestão da membrana coriônica não alterar a viabilidade do embrião, o tempo de exposição pode reduzir consideravelmente a porcentagem de sobrevivência. Após a retirada da membrana coriônica, foi observado um aumento da concentração do crioprotetor intra-embriônico, nos embriões de *Paralichthys olivaceus* (CABRITA et al., 2003) e *Scophthalmus maximus* (ZHANG et al., 2005), após serem imersos em uma solução de DMSO 5M, em relação aos embriões com córion intacto, fato este que auxiliaria nos processos de crioconservação.

A tecnologia do resfriamento, além de esbarrar nas diferentes osmolaridades das membranas, ainda encontra a alta sensibilidade dos embriões às baixas temperaturas. A sensibilidade dos embriões está diretamente ligada a sua fase de desenvolvimento embrionário, sendo inversamente proporcional ao desenvolvimento embrionário; ou seja, quanto maior o tempo de desenvolvimento embrionário mais resistente esses embriões são as baixas temperaturas (ZHANG; RAWSON, 1995). Esta característica possivelmente ocorre porque a temperatura exerce uma grande influência no metabolismo e desenvolvimento ontogenético (GWO et al., 1995). Para *Prochilodus lineatus* o estágio de organogênese com 20 somitos, demonstrou ser a mais resistente dentre os estágios testados, corroborando com os dados

descritos para embriões de *Tinca tinca*, que apresentou um número reduzido de larvas vivas em fases mais iniciais do seu desenvolvimento (EL-BATTAWY; LINHART, 2009).

Além disso, este trabalho foi identificado que quanto mais baixo a temperatura de exposição, menor é a taxa de sobrevivência larval, independente da fase embrionária testada. Corroborando com os dados encontrados por Fornari et al. (2011) para embriões de *Rhinelepis áspera*, que ao serem resfriados, por 6 horas, a uma temperatura de -8°C, também não tiveram sua viabilidade preservada

Para mitigar os danos gerados pela exposição às baixas temperaturas, faz-se necessário o uso de soluções crioprotetoras, que protegem tanto externamente quanto internamente as estruturas celulares; no entanto, essas soluções apresentam efeitos deletérios ao desenvolvimento embrionário, podendo ser letal ao organismo dependendo de sua concentração, tempo de exposição e fase de desenvolvimento embrionário submetido (HAGEDORN et al., 1997; SUZUKI et al., 1995; URBANYI et al., 1997, 1998); contudo, a toxicidade promovida pelas soluções crioprotetoras é espécie-específica.

Adam et al. (1993) ao estudar a atividade das enzimas LDH (lactate dehydrogenase) e G-6-PDH (glucose 6 phosphate dehydrogenase) em embriões de *rosy barb* nos estágios de clivagem e gastrulação (fechamento do blastoporo), após expor os embriões a uma solução de DMSO (4M), verificou uma redução na atividade enzimática de 100% e 28%, respectivamente. Confirmando o fato que a resistência aos crioprotetores varia de acordo com os estágios embrionários. Corroborando ao acima descrito, os embriões de *Prochilodus lineatus*, mostraram uma maior resistência nas fases de organogênese com seis e vinte somitos; semelhante ao encontrado para *Paralichthys olivaceus* (CHEN; TIAN, 2005), que apresentou uma maior resistência no estágio de organogênese com 10 somitos, que nos estágios iniciais.

Dinnyés et al. (1998) também descrevem, para o *Cyprinus carpio*, que a toxicidade de um mesmo crioprotetor pode variar de acordo com a fase de desenvolvimento embrionário, fato verificado em embriões de *P. lineatus*; além disso, a toxicidade dos crioprotetores também mostrou ter uma relação com a própria natureza das substâncias, indicando que os mais eficientes para os

processos de resfriamento foram o dimetil sulfóxido (DMSO) e o Propileno glicol (PROP).

O DMSO é considerado como um dos melhores crioprotetores por sua capacidade de efluxo e influxo celular, em um processo que é muito menos dependente da temperatura do que outros crioprotetores (SUZUKI et al., 1994), contudo os efeitos tóxicos do DMSO em peixes, quando usado em altas concentrações ou quando o tempo de exposição é estendido, ainda é pouco estudado (GWO et al., 2009; ROBLES et al., 2005).

A dimetil formamida (DMF) foi o único crioprotetor que não foi associado a outro crioprotetor interno. Isso ocorreu devido à necessidade de conhecer seus efeitos sobre os embriões do Curimatá, uma vez que nos processos de criopreservação de espermatozoides de Rainbow trout essa substância gerou excelentes resultados com uma taxa de fertilidade alcançando índices no entorno de 66,2% (MC-NIVEN et al., 1993). Neste experimento o DMF demonstrou ser tóxico para embriões de curimatá.

Durante o processo de resfriamento, o uso de soluções crioprotetoras com crescente osmolaridade objetiva mitigar o choque osmótico sofrido pelos embriões que estão em contato com um meio hipertônico, pois uma das atuações dos crioprotetores é promover a “desidratação” do material biológico, originando um processo de crenação no organismo (HAGEDORN et al., 1998) e consequentemente aumentando a sua concentração iônica interna, podendo assim, gerar danos irreversíveis. Desta forma, Chen e Tian (2005) desenvolveram um protocolo para crioconservar embriões de *Paralichthys olivaceus*, que possibilita a reduzir o estresse osmótico através da exposição do material biológico à concentrações crescentes de crioprotetores, semelhante ao aplicado em nossos protocolos, relatando a sobrevivência de algumas larvas pós descongelamento.

Hagedorn et al. (2002) descrevem que os embriões de zebrafish ao serem expostos a diferentes soluções osmóticas não respondem da mesma forma que outros vertebrados típicos, ou seja, uma célula normal de vertebrados em uma solução hipo-osmótica aumenta o seu volume enquanto que em uma solução hiper-osmótica diminui, no zebrafish há uma assimetria em sua membrana onde essa água sai, porém, não retorna da mesma forma,

devido a um complexo mecanismo de controle, que não possui o complexo aquaporina, ocorrendo desta forma o transporte de água por meio de difusão.

Para os testes de resfriamento, a escolha dos crioprotetores utilizados (DMSO, DMF e PROP) e o uso de crioprotetores associados foram baseados nos resultados gerados pelos testes de toxicidade e nos relatos de literatura (GWO et al., 2009; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008; ROBLES et al., 2005). Zhang et al., (2005) e Cabrita et al., (2002) comprovaram que a utilização da combinação de soluções crioprotetoras deram melhores resultados de proteção quando comparado com as soluções isoladas. Os embriões de curimatã demonstraram grande resistência ao processo de resfriamento, principalmente os submetidos à temperatura de 5°C chegando a apresentar resultados estatisticamente iguais ao controle; contudo, apesar da alta taxa de larvas vivas, os tratamentos promoveram, quase que em sua totalidade, larvas detentoras de alterações morfológicas graves como má-formação da notocorda e dos somitos; assim, torna-se inviável a aplicação dos protocolos de resfriamento como forma de transportar os embriões por longas distâncias ou o seu uso em pisciculturas para maximizar o uso de incubadoras. Os danos morfológicos apresentados foram semelhantes aos ocorridos na tentativa de resfriamento dos embriões de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), que apresentaram deformidades na notocorda e assim não detinham uma movimentação vigorosa após terem sido expostos ao DMSO (STREIT-JR et al., 2005).

Esses danos encontrados já são descritos nas fichas de informação sobre os produtos, sendo que o DMSO e a DMF pode promover mutação de células somáticas, danificar o ácido desoxirribonucleico (DNA) e gerar má-formação do sistema musculoesquelético de embriões de ratos. Contudo, apesar do PROP poder gerar distúrbios no sistema nervoso central, não existe descrição de má-formação de estruturas morfológicas por seu uso (SIGMA-ALDRICH, 2012).

Externamente, as larvas de *P. lineatus* apresentaram um corpo reduzido e tortuoso, resultado de uma notocorda sinuosa e uma disfunção do processo de miogênese, como mioseptos incompletos e miômeros fundidos de forma

desorganizada. Assim, consequência deste corpo limitado, o animal, quando consegue eclodir, não apresenta uma natação vigorosa, sendo assim inviável sua sobrevivência (NOTOLLA et al., 2007). A má formação das estruturas embrionárias é, provavelmente, influenciada pela atuação das próprias soluções crioprotetoras, que apresentam características químicas tóxicas, promovendo deformidades específicas no embrião. Nas fichas técnicas dos produtos crioprotetores, os fabricantes já alertam sobre seus efeitos sobre o desenvolvimento embrionário e outras características deletérias que poderiam apresentar, como: O DMSO pode promover mutação em células somáticas de mamíferos; danificação do e promover atrofia ou aborto em ratos, má-formação do sistema musculoesquelético; enquanto que a DMA pode gerar má-formação no feto, alterações no sistema reprodutivo, irritação no trato respiratório e na pele; o PROP e pode causar alterações do baço, irritação da pele uma irritação da pele e depressão do sistema nervoso central (SIGMA, 2012); fatos esses que provavelmente explicam a grande quantidade de células necróticas encontradas em nossas larvas e a fusão desalinhada dos mioblastos, durante o processo de miogênese, e da redução da camada de tecido conjuntivo que une a musculatura branca e vermelha nos peixes.

O vitelo é a estrutura considerada como a responsável pela sensibilidade dos embriões ao frio, e que, normalmente após os tratamentos de resfriamento e criopreservação, apresenta alterações de sua morfologia oriunda da individualização dos seus glóbulos, formando assim uma massa amorfa (LIU; RAWSON, et al., 1999; NEVES et al., 2012); essas alterações são explicadas pela ineficiência das soluções crioprotetoras que não conseguiram se difundir por toda a estrutura vitelínica, permitindo desta forma, a nucleação dos cristais de gelo. Os embriões do curimatá (*P. lineatus*), após os tratamentos de criopreservação, não apresentaram alterações visíveis sob a microscopia de luz; contudo, ao ser analisado sua ultraestrutura comprovou-se a presença de glóbulos de vitelo alterados; diferentemente ao descrito por Ninhaus-Silveira et al. (2008) com o mesmo modelo biológico (*Prochilodus lineatus*).

A camada sincicial de vitelo é uma estrutura utilizada como base nas avaliações pós-congelamento, servindo de uma medida para avaliar até que região no embrião o crioprotetor penetrou e manteve a integridade embrionária.

Quando a integridade embrionária não é mantida, a CSV apresenta tamanho e formas irregulares podendo ser encontrada em locais atípicos (no meio ou abaixo do vitelo) (NEVES et al., 2012), fato comprovado em nosso trabalho, promovido possivelmente por uma hidratação ineficiente do embrião, que permaneceu com seu volume reduzido após a perda de água durante o processo de resfriamento. Além de sua retração, a CSV pode possuir um citoplasma mais compacto e eletrondenso, um núcleo com cromatina desorganizado, rupturas na membrana plasmática próxima à endoderme e consequentemente microvilosidades danificados (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008).

Na blastoderme a difusão dos crioprotetores é maior que na região vitelínica, promovendo uma maior preservação das suas estruturas (SUZUKI et al., 1995) como o demonstrado para embriões do curimatá, que apresentava estruturas integras como somitos, tubo neural, endoderme e a ectoderme e mitocôndrias (NEVES et al., 2012; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008). Semelhante ao descrito, durante os teste de vitrificação, essas características foram verificadas, sendo encontrado células integras na região da blastoderme; contudo, no tratamento de resfriamento a blastoderme apresentou graves alterações resultando em alta concentração de células necróticas.

2.6 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que:

- A retirada da membrana coriônica não interfere no desenvolvimento embrionário de *P. lineatus*;
- Os embriões de *P. lineatus* são extremamente sensíveis às temperaturas de 0 e 5°C, sendo que, a sua resistência aumenta com o desenvolvimento embrionário;
- A toxicidade dos crioprotetores é menor nas fases de maior desenvolvimento embrionário, sendo o propileno glicol (PROP) o crioprotetor mais eficiente nos protocolos avaliados por promover semelhanças estatísticas ao controle em todos os protocolos de resfriamento avaliados;
- Os protocolos de resfriamento resultaram em altos índices de sobrevivência, entretanto, mostraram-se inviáveis devido há altas taxas de deformidades presentes nas larvas.
- Nos tratamentos de resfriamento inúmeras alterações morfológicas, resultantes das baixas temperaturas e toxicidade dos crioprotetores, geraram deformidades como: corpos de tamanho reduzido e/ou tortos, crescimento celular descontrolado das nadadeiras embrionárias, má-formação das narinas, olhos e musculatura, formação de vitelo retraído e com glóbulos alterados, rupturas de membranas, entre outras que inviabilizaram o desenvolvimento embrionário.

2.7 REFERÊNCIAS

ADAMS, S. L.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. The effect of external medium composition on membrane water permeability of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 64, n. 7, p. 1591-1602, 1993.

CABRITA, E.; ROBLES, V.; CHEREGUINI, O.; DE PAZ, P.; ANEL, L.; HERRAÉZ, M. P. Dimethyl sulfoxide influx in turbot embryos exposed to a vitrification protocol. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 60, n. 3, p. 463-473, 2003.

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. **Conservação de recursos genético de peixes: teoria e prática**. Tradução de H. P. Godinho. Victoria: World Fisheries Trust, 1999. Curso de treinamento brasileiro.

CHEN, S. L.; TIAN, Y. S. Cryopreservation of flounder (*paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 63, n. 4, p. 1207-1219, 1 Mar. 2005.

DINNYÉS, A.; URBÁNYI, B.; BARANYAI, B.; MAGARY, I. Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants: work in progress. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 50, n. 1, p. 1-13, 1 July 1998.

EL-BATTAWY, K.; LINHART, O. Preliminary studies on cryopreservation of common tench (*tinca tinca*) embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 44, n. 4, p. 718-723, Aug. 2009.

FORNARI, D. C.; RIBEIRO, R. P.; STREIT-JR, D. P. Effect of cryoprotectants on the survival of cascudo preto (*rhinelepis aspera*) embryos stored at -8°C . **Zygote**, Cambridge, FirstView Article, p. 1-6, 26 Aug. 2011.

GWO, J. C.; JAMIESON, B. G. M.; LEUNG, L. K. P. Live preservation of fish gametes. In: JAMIESON, B. G. M. **Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and Bony fishes)**. Queensland: Science Publishers, 2009. Cap. 11, p. 395-484.

HAGEDORN, M.; HSU, E. W.; PILATUS, U.; WILDT, D. E.; RALI, W. F.; BLACKBAND, S. J. Magnetic resonance microscopy and spectroscopy reveal kinetics of cryoprotectant permeation in a multicompartamental biological system. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, DC, v. 93, n. 15, p. 7454-7459, 23 July 1996.

HAGEDORN, M.; KLEINHANS, E. W.; ARTEMOV, D.; PILATUS, U. Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 59, n. 5, p. 1240-1250, Nov. 1998.

HAGEDORN, M.; KLEINHANS, E. W.; WILDT, D. E.; RALL, W. E. Chilling sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos,

Bracrydanio rerio. **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 34, n. 3, p. 251-263, May 1997.

HAGEDORN, M.; LANCE, S. L.; FONSECA, D. M.; KLEINHANS, F. W.; ARTEMOV, D.; FLEISCHER, R.; HOQUE, A. T. M. S.; HAMILTON, M. B.; PUKAHENTHI, B. S. Altering fish embryos with aquaporin-3: an essential step toward successful cryopreservation. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 67, n. 3, p. 961-966, 2002.

HARVEY, B.; KELLEY, R. N.; ASHWOOD-SMITH, M. J. Permeability of intact and dechorionated zebra fish embryos to glycerol and dimethyl sulfoxide. **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 20, n. 4, p. 432-439, Aug. 1983.

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**, Philadelphia, v. 55, n. 8, p. 1719-1731, 1 May 2000.

LIU, X. H.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. The effect of partial removal of yolk on the chilling sensitivity of zebrafish (*danio rerio*) embryos. **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 39, n. 3, p. 236-242, Nov. 1999.

MCNIVEN, M. A.; CALLANT, R. K.; RICHARDSON, G. F. Dimethyl acetamide as a cryoprotectant for rainbow trout spermatozoa. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 40, n. 5, p. 943-948, Nov. 1993.

NEVES, P. R. **Utilização de crioprotetores intra e extracelulares em embriões de pacu (*Piaractus mesopotâmicus*)**. 2008. 71 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.

NEVES, P. R.; RIBEIRO, R. P.; STREIT-JR, D. P. Injuries in pacu embryos (*Piaractus mesopotamicus*) after freezing and thawing. **Zygote**, Cambridge, FirstView Article, p. 1-7, July 2012.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A.; CLAUDI, A. A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Cryogenic preservation of embryos of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote**, Cambridge, v. 17, n. 1, p. 45-55, 2008.

NOTTOLA, S. A.; MACCHIARELLI, G.; BORINI, A. Ultrastructure of human mature oocytes after slow cooling cryopreservation using different sucrose concentrations. **Human reproduction**, Oxford, v. 22, n. 4, p. 1123-1133, 2007.

PALASZ, A. T.; THUNDATHIL, J.; FUENTE, J. Effect of reduced concentration of glycerol and various macromolecules on the cryopreservation of mouse and cattle embryos. **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 41, n. 1, p. 35-42. 2000.

ROBLES V.; CABRITA, E.; FLETCHER, G. L.; SHEARS, M. A.; KING, M. J.; HÉRRÆZ, M. P. Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 64, n. 7, p. 1633-1646, 15 Oct. 2005.

ROBLES V.; CABRITA, E.; REAL, M.; ÁLVAREZ, R.; HÉRRÁEZ, M. P. Vitrification of turbot embryos: preliminary assays. **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 47, n. 1, p. 30-39, Aug. 2003.

ROBLES, V.; CABRITA, E.; ACKER, J. P. Embryo cryopreservation: what we know until now. In: CABRITA, E.; ROBBLES, V.; HERRÁEZ, P. (Comp.). **Methods in Reproductive Aquaculture**. New York: Taylor & Francis, 2009. Cap. 9, p. 265-294.

ROBLES, V.; CABRITA, E.; PAZ, P.; CUÑADO, S.; ANEL, L.; HERRÁEZ, M. P. Effect of a vitrification protocol on the lactate dehydrogenase and glucose-6-phosphatase dehydrogenase activities and the hatching rates of Zebrafish (*Danio rerio*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 61, n. 7/8, p.1367-1379, 5 Aug. 2004.

SCHNEIDERB, U.; MAZUR, P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 21, n. 1, p. 68-79, Jan. 1984.

SEREAN, L.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. The effect of external medium composition on membrane water permeability of zebrafish (*danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 64, n. 7, p. 1591-1602, 15 Oct. 2005.

SIGMA-ALDRICH. **Ficha de informações de segurança de produtos químicos - GLICEROL**. São Paulo, 2011. 6 p.

SIGMA-ALDRICH. **Ficha de informações de segurança de produtos químicos - DIMETIL ACETAMIDA**. São Paulo, 2012. 7 p.

SIGMA-ALDRICH. **Ficha de informações de segurança de produtos químicos - DIMETIL SULFÓXIDO**. São Paulo, 2012. 7 p.

SIGMA-ALDRICH. **Ficha de informações de segurança de produtos químicos - 1,2-PROPANODIOL**. São Paulo, 2012. 7 p.

STREIT-JR, D. P.; DIGMAYER, M.; RIBEIRO, R. P.; SIROL, R. N.; MORAES, G. V.; GALO, J. M. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, n. 42, n. 8, p.1199-1202, ago. 2007.

STREIT-JR, D. P. **Crioprotetores e resfriamento de embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2005. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005.

SUZUKI, T.; KOMADA, H.; TAKAI, R.; KEIJI, A.; KOZIMA, T. T. Relation between toxicity of cryoprotectant DMSO and its concentration in several fish embryos. **Fisheries Science**, Tokyo, v. 61, n. 2, p.193-197, 3 Mar. 1995.

URBANYI, B.; BARANYAI, B.; DINNYÉS, A. T. Chilling sensitivity of non-activated carp (*Cyprinus carpio*) eggs. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 49, n. 1, p. 175, 1998.

URBANYI, B.; BARANYAI, B.; MAGYARY, I.; DINNYÉS, A. Toxicity of methanol, DMSO and glycerol on carp (*Cyprinus carpio*) embryos in different developmental stages. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 47, n. 1, p. 408, 1 Jan. 1997.

ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Studies on chilling sensitivity of Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Embryos. **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 32, n. 3, p. 239-246, 1995.

ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Feasibility studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 33, n. 1, p. 1-13, Feb. 1996.



3 CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE PEIXES NEOTROPICAIS PELO MÉTODO DE VITRIFICAÇÃO

(Relacionado aos objetivos 3 e 4)

3.1 RESUMO

A criopreservação é uma ferramenta biotecnológica que permite congelar e estocar, por longos períodos células, tecidos, órgãos e embriões. Contudo, o sucesso desta tecnologia para peixes é bem estabelecido apenas para os espermatozoides, conservando parcialmente material genético de uma população. Desta forma objetivou-se estabelecer um eficaz protocolo para a vitrificação de embriões de peixes neotropicais. Utilizou-se como modelo biológico embriões de *Prochilodus lineatus* obtidos por reprodução de exemplares adultos e maduros do plantel de reprodutores existente no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais - CEPTA/ICMBIO. Anteriormente a vitrificação, foram realizados testes com 29 soluções crioprotetoras, buscando qual apresentaria uma melhor vitrificação. Determinada a solução, os embriões foram expostos a uma série crescente de osmolaridade das soluções crioprotetoras, sendo por fim imersos diretamente no nitrogênio líquido e mantido em estoque por um período de nove dias. Após este período, os embriões foram descongelados utilizando um 'banho-maria' à 60°C, por um período de 10 segundos, em seguida estes foram levados à incubação. Das vinte e nove soluções testadas, cinco (dimetil sulfóxido-DMSO [6] +sacarose-SAC [0,2], etileno glicol-ET [P], glicerol-GLI [P], GLI [5] +SAC [0,2] e propileno glicol-PROP [5] + DMSO [5]) apresentaram a característica de vitrificação quando imersas no nitrogênio líquido, não sendo observado, em nenhum instante, a formação esbranquiçada dos cristais de gelo; contudo, ao realizarmos o descongelamento dos embriões verificou-se um branqueamento nas palhetas próximo a região dos embriões, indicando o crescimento dos cristais de gelo. Os embriões ao serem descongelados e levados para continuar seu desenvolvimento embrionário, apresentavam um aumento em seu volume e conseguinte deterioração de suas estruturas. Assim não foi possível estabelecer um protocolo viável para a vitrificação dos embriões do curimatá.

Palavras-Chave: Congelamento. Crioprotetores. Gelo. Nucleação. Curimbatá.

3.2 INTRODUÇÃO

Há mais de dois séculos, cientistas pesquisam metodologias para preservar a viabilidade de gametas de peixes; enquanto que, até meados do século passado, seus estudos iniciais baseavam-se em prolongar a vida dos gametas no estado não congelado (HORTON; OTT, 1976). Nos últimos cinquenta anos, as pesquisas alteraram seu foco buscando o desenvolvimento de técnicas de congelamento profundo (-196°C), a fim de preservar o material biológico “indefinidamente”, uma vez que, nesta temperatura, nenhum processo químico ou biológico pode ser verificado. Embriões como os de peixes, répteis, pássaros e anfíbios, que possuem uma grande carga de vitelo, formam um grupo de animais detentores de um complexo sistema biológico que, até agora, impediu a formulação de um protocolo de criopreservação efetivo e reproduzível (HAGEDORN et al., 1998; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2007; SHAW et al., 2000). O termo criopreservação é utilizado para descrever o congelamento e o estoque por longos períodos, de células vivas, tecidos, órgãos e embriões. Sendo uma biotecnologia comumente utilizada como ferramenta na reprodução de animais domésticos e humanos, tanto que no ano de 1996 na Austrália e Nova-Zelândia 13.430 embriões humanos foram congelados, descongelados e transferidos, enquanto 41.662 permaneceram em estoque (SHAW et al., 2000).

O sucesso desta técnica é bem estabelecido para espermatozoides de inúmeras espécies de peixes; contudo, a criopreservação e o resfriamento de ovócitos e embriões de teleósteos continuam sem um protocolo estabelecido. Todavia, a conservação do material biológico sob temperaturas extremamente baixas é desejável por motivos comerciais e biológicos. Comercialmente, possibilita reduzir os custos de produção, que atualmente é dependente de um único período reprodutivo para suprir a demanda de pescado anual, acarretando a necessidade de grandes estruturas para mantê-los, e biológicos como uma solução ambiental para as espécies em risco de extinção, por possibilitar a formação de bancos genéticos, que possuam uma amostra representativa da bagagem genética das populações, assegurando assim o mínimo de variabilidade genética necessário (GWO et al., 2009; HARVEY; CAROLSFELD, 1993; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2003, 2006).

Naturalmente, nas regiões polares, existem plantas e animais que suportam temperaturas abaixo de zero (-80°C). No entanto, muitas células de mamíferos morrem quando expostas a temperaturas subzero quando colocadas em soluções que não as protejam do congelamento e descongelamento (HAGEDORN et al., 1997; SHAW et al., 2000). Assim, um processo de criopreservação necessita de substâncias que protejam a viabilidade celular, e uma taxa de resfriamento adequada, linear ou não linear (mais complexa), que leva o material biológico de sua temperatura fisiológica à -196°C (temperatura do nitrogênio líquido LN_2). No decorrer deste processo, as células tem a capacidade de desidratar e incorporar os crioprotetores presentes na solução a qual estão imersas (HARVEY; CAROLSFELD., 1993; ROBLES et.al., 2005 e 2009).

A criopreservação pode ser dividida em três tipos, baseadas nas curvas de resfriamento: 1 - Congelamento: a temperatura é lentamente reduzida a uma taxa de resfriamento variando entre $0,5$ e $1,2^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, e o material é exposto ao vapor de nitrogênio ou ao gelo seco. Neste processo, o tempo para o congelamento é maior e permite desta forma, o efluxo da água e o influxo de crioprotetores. Contudo o tempo de exposição do material biológico ao crioprotetor aumenta, potencializando assim sua toxicidade, que por vez pode culminar na redução no número de larvas vivas viáveis (POLGE; WILLADSEN., 1978; ROBLES et al., 2003). 2 - Congelamento ultrarrápido: os embriões são resfriados por um acelerado procedimento de resfriamento ($-170^{\circ}\text{C}/\text{min}$) até atingir uma temperatura de -30°C e serem mergulhados em nitrogênio líquido (NIEMANN et al., 1991). 3 – Vitrificação: a redução da temperatura ocorre rapidamente, sendo o material mergulhado diretamente no nitrogênio líquido fazendo com que a parte sólida mantenha a estrutura molecular e a concentração iônica da parte líquida, exibindo uma estrutura vítrea, que pode ser entendido como um líquido supercongelado extremamente viscoso. Contudo, nesta técnica o tempo de exposição ao crioprotetor é reduzido e o período do efluxo de água e do influxo de crioprotetor são reduzidos, podendo fazer com que a desidratação não seja eficiente facilitando a formação de grandes cristais de gelo. Contudo, os princípios básicos de todos os protocolos são os mesmos na medida em que se destinam a proteger as células contra os

efeitos do congelamento (refrigeração), formação de gelo intracelular e desidratação (HORTON; OTT, 1976; SHAW et al., 2000; ROBLES et al., 2003).

O primeiro protocolo de congelamento foi estabelecido em 1949 quando Polge e colaboradores conseguiram congelar e descongelar embriões, óvulos e espermatozoides de aves usando o glicerol como um crioprotetor e desde então um considerável progresso na área foi conquistado. Contudo, a criopreservação continua envolvendo inúmeras variáveis e provavelmente nenhum conhecimento poderá ser adotado como universal devido há muitas diferenças entre os estágios embrionários, dos oócitos e das diferenças que são espécie-específicas (POLGE; WILLADSEN, 1978; HAGEDORN et al., 2002; SHAW et al., 2000).

Contudo, na crioconservação, não só o processo de congelamento é importante, pois mesmo que o material seja corretamente congelado, ainda pode ser danificado em seu descongelamento (ROBLES et al., 2004).

O processo de descongelamento é apenas o reverso do congelamento; ou seja, o material precisa de um período para se reidratar e permitir o efluxo do crioprotetor, que após a criopreservação está em alta concentração em seu interior. Junto a isso, o descongelamento precisa ocorrer rapidamente, não permitindo que os pequenos cristais de gelo, formados no processo de congelamento, cresçam ao passarem na faixa de temperatura de -40 a 0°C, e danifiquem o material criopreservado (CAROLSFELD; HARVEY, 1999).

3.2.1 Dificuldades na crioconservação

Em peixes, como em outros pequenos vertebrados, os ovos possuem grande quantidade de vitelo e sofrem clivagens discoidais parciais após a fertilização; ou seja, apenas o blastodisco sofre divisões, formando assim a blastoderme que originará o embrião, enquanto que o vitelo permanece sem dividir-se. Os embriões são complexos sistemas biológicos com três diferentes compartimentos: um grande vitelo, um compartimento celular (o desenvolvimento do embrião ou blastoderme em desenvolvimento inicial) e o espaço perivitelínico. O vitelo é revestido por uma camada sincicial e, o espaço perivitelínico cerca estes compartimentos, delimitado por outra membrana, o

córion, que é formado por uma proteína denominada coriogenina produzida pelo fígado (ROBLES et al., 2009; JARAMILLO et al., 2012).

No entanto, cinco fatores são os principais suspeitos que dificultam o processo de criopreservação de embriões de teleósteos: (1) um grande volume, que resulta em uma baixa relação de superfície/volume; (2) uma grande quantidade de vitelo que pode facilitar a formação de cristais de gelo e consequentemente promover a ruptura das membranas; (3) compartimentos como a blastoderme e o vitelo que diferem em suas propriedades de permeabilidade; (4) membranas semipermeáveis no entorno do embrião que podem dificultar o efluxo e influxo de água e crioprotetores; (5) suscetibilidade as injúrias promovidas pelas baixas temperaturas (HAGEDORN et al., 1996; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008; ROBLES et al., 2009).

Inúmeras alterações físicas e biológicas ocorrem com as células expostas ao ciclo de redução e aumento da temperatura nos processos de criopreservação (Tabela 1) (POLGE; WILLADSEN, 1978; SHAW et al., 2000).

INJURIAS DA CRIOCONSERVAÇÃO

Tabela 1 - Danos gerados às estruturas celulares pelos tratamentos de crioconservação .

Sistema	Causa e local das injurias
Todo	Formação de gelo intracelular, formação de gelo extracelular, apoptose, toxicidade, desequilíbrio de cálcio, radicais livres, níveis de ATP, metabolismo em geral, falha na fertilização e falha na clivagem.
Membrana	Ruptura, fusão microvilosidade, perda e transição de fase.
Cromossomos	haploidia
DNA	Apoptose, rearranjos e translocações.
Proteínas/enzimas	Desidratação e perda da função
Ultraestrutura	Microvilosidade, mitocôndrias, vesículas, grânulos corticais e zona pelúcida.
Lipídeos	Radicais livres.

Fonte: SHAW et al., 2000.

A primeira grande barreira para a criopreservação de embriões de peixes é a membrana coriônica, formada por um arranjo complexo de proteínas denominado coriogenina sintetizada no fígado das fêmeas durante a reprodução, que pode impedir o trânsito da água e do soluto para dentro e para fora do embrião. Após a fecundação, ocorre também a formação do espaço perivitelino, formado pelos grânulos corticais que liberam um tipo de polissacarídeo ácido glicosilado demasiadamente grande para atravessar o córion, e que fica acumulado entre o córion e a membrana plasmática aumentando a osmolaridade do fluido presente. Deste modo, produz uma

movimentação de água e eletrólitos para o interior do ovo fecundado aumentando a pressão osmótica do espaço perivitelino, que por sua vez obriga as fibras elásticas do córion a se expandir e perderem sua elasticidade (JARAMILLO et al., 2012). Entretanto, essas estruturas podem ser removidas por meio de microcirurgia ou por digestão enzimática utilizando uma solução de protease. A segunda barreira encontrada diz respeito à osmolaridade da água através da blastoderme e do vitelo; deste modo, é importante compreender que o trânsito da água por esses compartimentos é de extrema importância para a desidratação do material que, por exemplo, no caso de embriões do zebrafish (*Danio rerio*), com seis somitos, possui uma alta taxa de hidratação.

O compartimento de vitelo representa 61% do volume total enquanto que os 39% representam a blastoderme. Junto a isso, a quantidade de água presente é distribuída de forma desigual, sendo que o total de água no embrião é de 74%, o vitelo possui 42% e a blastoderme 82%. Desta forma, a remoção osmótica desta grande quantidade de água é essencial para a criação de um protocolo efetivo de criopreservação. Pois quando a temperatura é reduzida inicia-se a nucleação de cristais de gelo na solução (semeadura – “seeded”) (HAGERDORN et al., 1997). Com os cristais de gelo aumentando a solução é convertida do estado líquido para o sólido, sendo que isso aumenta a concentração dos solutos nas frações líquidas remanescentes, que por sua vez, promovem a saída de água das células. Em menores temperaturas é que a água pode sair mais das células e ser incorporada ao gelo, contudo a taxa em que a água sai da célula também é reduzida junto à redução da temperatura. Assim o sucesso do congelamento depende de se encontrar um equilíbrio ideal entre a taxa de água que sai da célula e a taxa em que esta é convertida em gelo.

O tratamento sob-baixas temperaturas de alguns tecidos ou estruturas biológicas requerem o uso de específicas soluções crioprotetoras que devem protegê-las da crioinjúria (ROBLES et al., 2003; NEVES, 2008). Nestes casos o material biológico é suficientemente desidratado e permeado pelos crioprotetores, tolerando a imersão direta no nitrogênio líquido ou vapor de nitrogênio. Um alto número de soluções são desenvolvidas e se solidificam sem nucleação dos cristais de gelo, obtendo uma forma vítrea. Evidências

comprovam que a formação de cristais de gelo durante o congelamento ou vitrificação promovem muito mais danos que os cristais nucleados durante o descongelamento. Desta forma observou-se que as misturas de crioprotetores podem representar algum avanço em relação aos crioprotetores isolados (SHAW et al., 2000).

A realização de um adequado equilíbrio entre as concentrações dos crioprotetor é a chave no processo de criopreservação e muitos esforços têm sido feitos no desenvolvimento de metodologias para a permeabilização dos embriões. O córion, a primeira camada semipermeável, permite a entrada de água e outras pequenas moléculas, incluindo alguns crioprotetores, assim como o DMSO. No entanto, algumas espécies, como o *Danio rerio* e o *Prochilodus lineatus*, são relativamente fáceis de serem descorinificadas, através de soluções enzimáticas de proteases, sem promover alterações no desenvolvimento embrionário, gerando uma maior taxa de difusão dos crioprotetores nos embrião (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008; ROBLES et al., 2009; SEREAN et al., 2005).

Na maioria dos estudos, os embriões são considerados como uma esfera homogênea devido à dificuldade de avaliar as reais características de permeabilidade da blastoderme e do vitelo. Ao comparar a taxa de difusão dos crioprotetores nos dois compartimentos embrionários, verificou-se que a permeabilidade da água é similar tanto no saco vitelínico quanto na blastoderme. Característica esta, que difere da permeabilidade dos crioprotetores, que são marcadamente maior na blastoderme do que no saco vitelínico (ROBLES et.al., 2005, 2009; SUZUKI et al., 1995, 2005). Assim, objetivou-se descrever um protocolo viável para a vitrificação de embriões de peixes neotropicais.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Embriões

Descrito na primeira parte do trabalho.

3.3.2 Testes de vitrificação das soluções crioprotetoras

Para a escolha das soluções crioprotetoras, realizou-se testes prévios com distintas concentrações e associações de crioprotetores internos e externos. As soluções foram aspiradas em palhetas criogênicas IMV estéreis para ênvase de sêmen ou embriões de 0,50 mL e mergulhadas em nitrogênio líquido (N_2L) por um período de trinta segundos. Avaliou-se, quais seriam as soluções que vitrificariam totalmente, vitrificariam parcialmente ou congelariam (Figura 29). As substâncias avaliadas e suas concentrações estão relacionadas na Tabela 2.

3.3.4 Vitrificação

O teste iniciou com a retirada da membrana coriônica embrionária, através de uma solução da enzima Pronase-E. Em seguida seguiam por banhos de crescente molaridade, terminando com uma associação dos crioprotetores internos (PROP + DMSO) e externo (sacarose/SAC) (Figura 30). Ainda embebidos na última solução, os embriões foram succionados para palhetas de 0,5 mL (IMV) estéreis, sendo que, cada palheta continha em torno de oito embriões dispostos de forma a não manterem um contato direto entre eles, ficando assim rodeados apenas pela solução crioprotetora (Figura 29a). Depois do acondicionamento dos embriões, as palhetas eram limpas e armazenadas em canisters metálicos (Figura 37b), que por sua vez foram depositadas em canecas metálicas (Figura 37a e 37c) e assim mergulhadas rapidamente em nitrogênio líquido (NL_2) (Figura 38b e 38c), contido em um botijão criogênico MVE de 20L (Figura 38d), onde ficaram armazenados por um período de 9 dias.

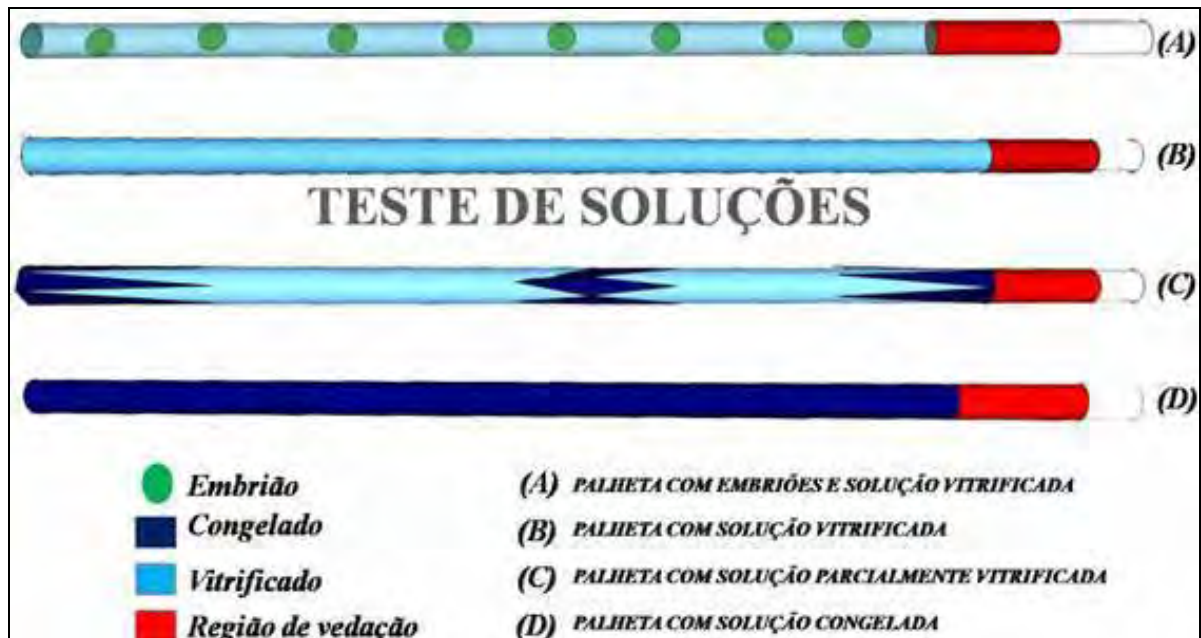
Durante o descongelamento, utilizou-se um banho-maria digital, que manteve a água a uma temperatura de 60°C, onde as palhetas, após serem rapidamente retiradas das raques, foram mergulhadas e agitadas vigorosamente por um período de 10 segundos. Em seguida, com ajuda de uma tesoura a palheta foi cuidadosamente cortada, em sua extremidade com a vedação, liberando assim os embriões em uma placa de Petri com água do meio, para retomar seu desenvolvimento.

Tabela 2 - Teste de soluções vitrificantes.

➤ ÁGUA[P]	➤ ET[6] +SAC[0,2]
➤ DMA [P]	➤ ETIL[5]
➤ DMA[5]	➤ GLI[P]
➤ DMA[7] + SAC[0,2]	➤ GLI[1]
➤ DMF[P]	➤ GLICEROL[5] +SAC[0,2]
➤ DMF[5]	➤ MET[P]
➤ DMF[5] + PROP[5]	➤ MET[2]
➤ DMF[5] + DMSO[5]+ET[5]+ SAC[0,2]	➤ PROP[P]
➤ DMSO[P]	➤ PROP[5] + DMSO[5]
➤ DMSO[5]	➤ PROP[5] + SAC[0,2]
➤ DMSO[5] +DMF[5]	➤ PROP[5] +DMF[5]
➤ DMSO[6] +SAC[0,2]	➤ PROP[5] +DMF[5] +DMSO[5]
➤ ET[P]	➤ PROP[5]
➤ ET[5] + DMSO[5] + DMF[5]	➤ PROP[5] + ET[5] + SAC[0,2]
➤ ET[5] + DMSO[5]	

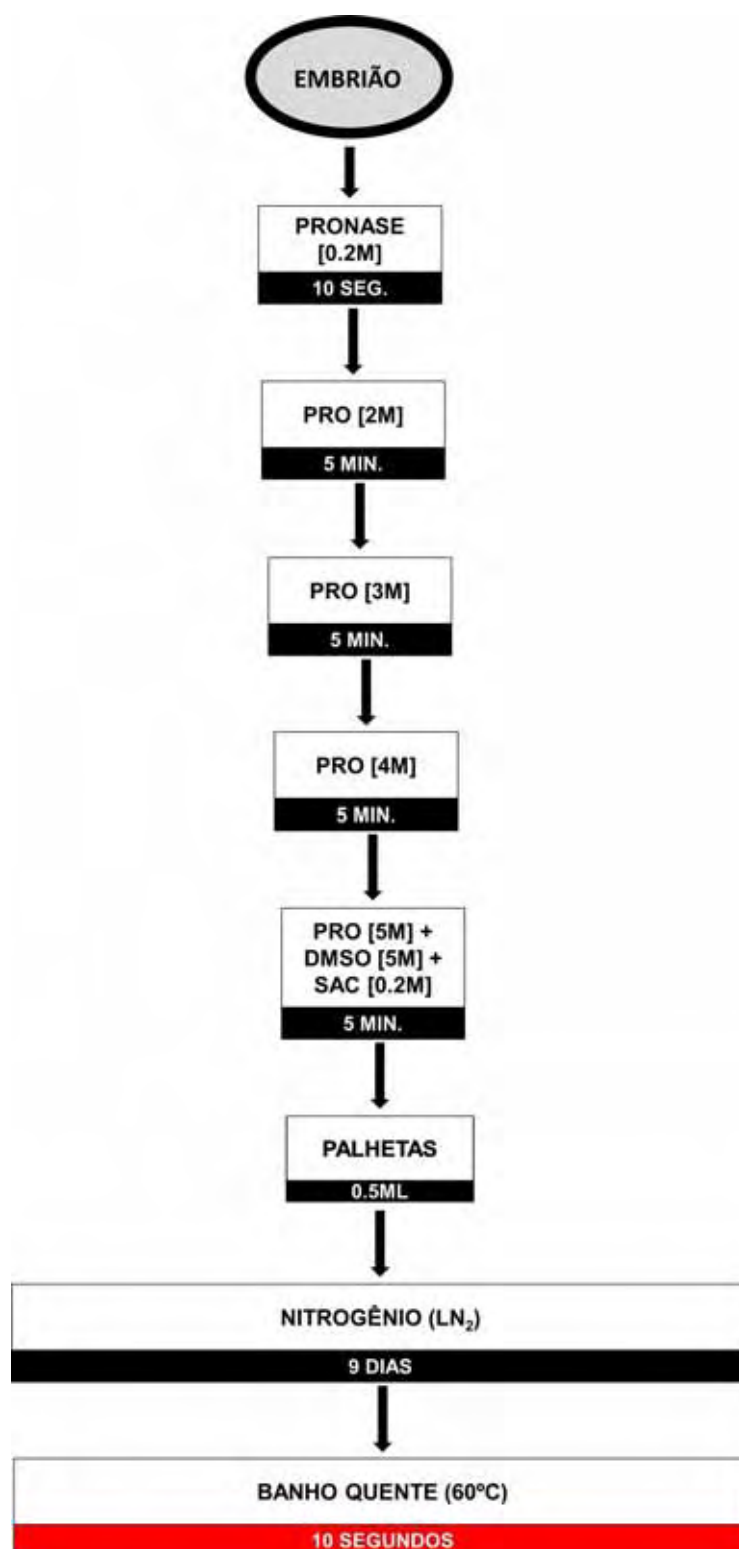
[P] - Puro; [] Concentração molar; **DMSO** - Dimetilsulfóxido; **DMF** - Dimetilformamida; **SAC** - Sacarose; **ET** - Etilenoglicol; **DMA** – Dimetilacetamida; **PROP** – Propilenoglicol; **GLI** –Glicerol e **MET** – Metanol. **Fonte:** Dados da pesquisa.

Figura 29 – Características avaliadas nas palhetas expostas ao nitrogênio líquido; formação de cristais de gelo e forma vítrea.



Fonte: Elaboração do próprio autor.

Figura 30 – Organograma do processo de vitrificação de embriões com seis e vinte somitos.



Legenda: [M]- concentração molar; **PROP** – propileno glicol; **DMSO** - dimetil sulfóxido e **SAC** - sacarose. **Fonte:** Elaboração do próprio autor.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Vitrificação das soluções crioprotetoras.

Dentre as 29 (vinte e nove) soluções testadas, as que não apresentaram indícios de nucleação de cristais de gelo estão discriminadas na tabela abaixo (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados dos testes de vitrificação das soluções crioprotetoras.

CRIOPROTETORES	CONGELAMENTO	VITRIFICAÇÃO PARCIAL	VITRIFICAÇÃO
ÁGUA [P]	X		
DMA [P]	X		
DMA [5]	X		
DMA [7] + SAC [0,2]	X		
DMF [P]	X		
DMF [5]		X	
DMF [5] + PROP [5]		X	
DMF[5] + DMSO [5]+ET [5]+SAC[0,2]		X	
DMSO [P]	X		
DMSO [5]		X	
DMSO [5] +DMF [5]		X	
DMSO [6] +SAC [0,2]			X
ET [P]			X
ET [5] + DMSO[5] + DMF [5]		X	
ET[5] + DMSO [5]	X		
ET[6] +SAC		X	
ET [5]	X		
GLI [P]			X
GLI [1]	X		
GLI [5] +SAC [0,2]			X
MET [P]	X		
MET [2]	X		
PROP [P]	X		
PROP [5] + DMSO [5]			X
PROP [5] + SAC [0,2]		X	
PROP [5] +DMF [5]		X	
PROP[5] +DMF[5] +DMSO [5]		X	
PROP [5]		X	
PROP[5] + ET[5] + SAC [0,2]		X	

Legenda: [P] produto puro; [] concentração molar do produto; **DMA** dimetil acetamida; **SAC** sacarose; **DMF** dimetil formamida ; **DMSO** dimetil sulfóxido; **PROP** propileno glicol; **MET** metanol; **GLI** glicerol; **ET** etileno glicol. **Fonte:** Dados da pesquisa.

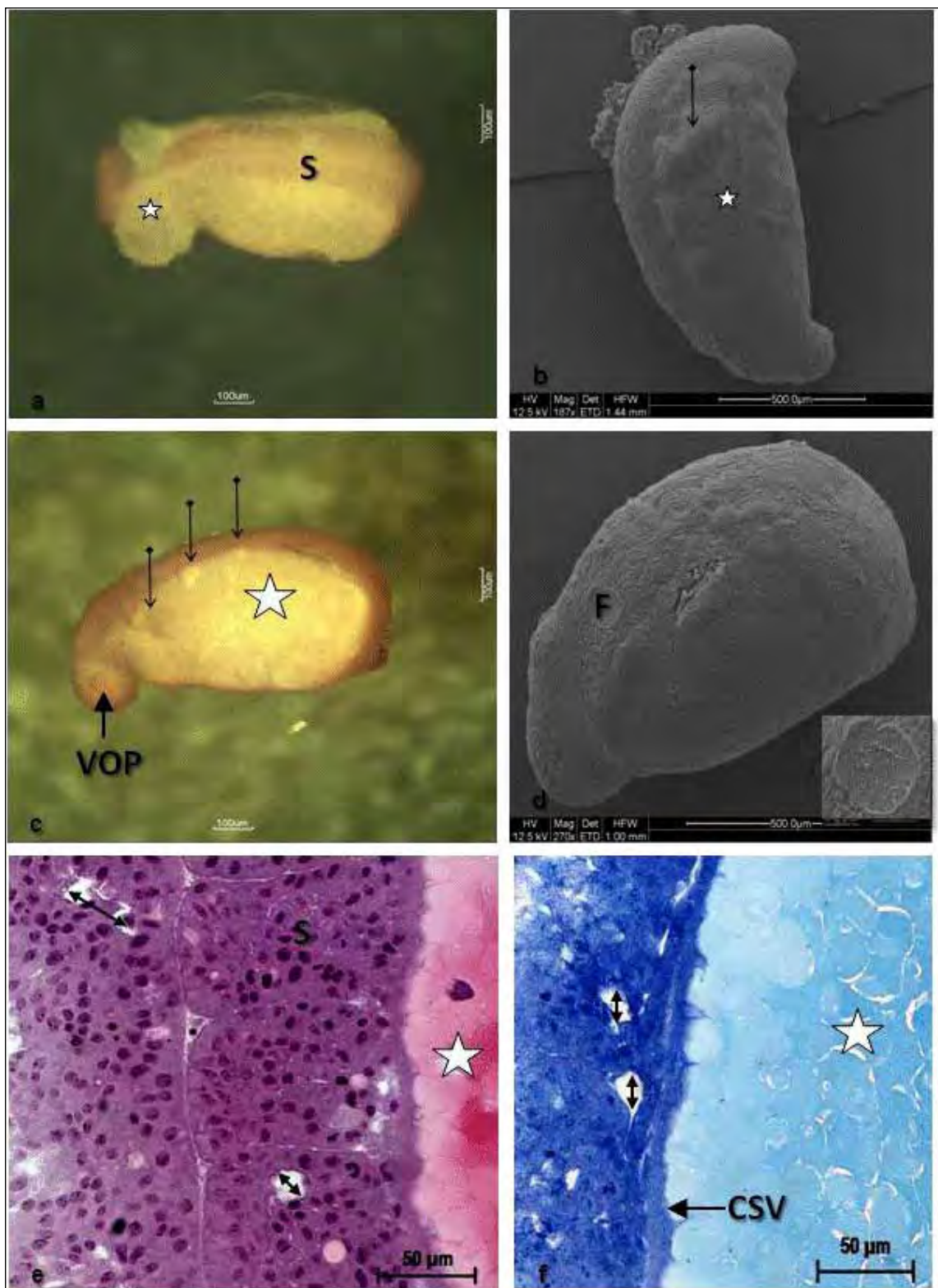
3.4.2 Criopreservação e Descongelamento

A vitrificação dos embriões de *P. lineatus* imerso em solução crioprotetora de Propileno glicol (PROP[5M] + DMSO[5M] + SAC[0,2M]) foi considerada efetiva, por manter toda a palheta transparente, não havendo indicação aparente da formação de cristais de gelo (aspecto opaco) extra e intra-embrionária ao longo do processo. Entretanto, durante o descongelamento ocorreu à formação de grandes cristais de gelo, caracterizado pelo branqueamento das palhetas.

Os embriões pós-vitrificação apresentaram espaços entre as células (Figuras 31e e 31f) e os glóbulos de vitelo. Externamente, seu vitelo demonstrou protuberâncias (Figuras 31b e 31c) e em casos mais extremos extravasou para fora do saco vitelínico (Figura 31a). Foram verificadas formações circulares limitadas por fragmentos da epiderme (Figura 31d). As características das fases embrionárias como somitos, vesícula óptica e vesícula ótica não se mantiveram pós-descongelamento (Figuras 31b e 31d). Ao serem depositados em Placas de Petri para a hidratação e dar continuidade ao seu desenvolvimento embrionário, começavam a sofrer um aumento em seu volume e se desfaziam. Não houve sobrevivência dos embriões pós-descongelamento.

Figura 31 - Morfologia dos embriões criopreservados de *Prochilodus lineatus*.

Legenda: **A** e **B** – Embrião em Organogênese com 20 somitos; **B** e **C** – Embrião em Organogênese com 6 somitos; **E** e **F** - Corte longitudinal de embriões criopreservados. **A** – Extravasamento do vitelo, corado em Hematoxilina, escala de 100µm; **B** – Embrião criopreservado, MEV, escala de 500µm; **C** – Embrião criopreservado com seis somitos, corado em Hematoxilina, escala de 100µm; **D** – Embrião criopreservado com seis somitos, MEV, escala 500µm; **E** – Corte embrionário transversal, corado em H.E., escala 50µm; **F** - Corte embrionário transversal, corado em azul de toluidina, escala 50µm. **Estrela** – vitelo; **S** – somitos; **VOP** – vesícula óptica; **CSV** – camada sincicial de vitelo; **F** – formação circular; **Seta dupla** – espaço entre as células; **◆→** protuberância.



Fonte: Elaboração do próprio autor.

3.5 DISCUSSÃO

Os cristais de gelo são as principais fontes de injúrias promovidas pelos protocolos de criopreservação, uma vez que, ao se nuclearem eles apresentam um aumento em seu volume e formam ponta semelhante a lanças, que acaba por danificar o material criopreservado, danificando estruturas celulares e rompendo as membranas. Desta forma, encontrar soluções crioprotetoras que permitam abaixar o ponto crioscópico do meio e consequentemente impedir a nucleação dos cristais é essencial nos processos de criopreservação (GWO et al., 2009). Por esse motivo, nesse trabalho foram testados vinte e nove soluções, quanto a sua capacidade de vitrificação, das quais, cinco soluções apresentaram um estado vítreo, ao serem mergulhadas em nitrogênio líquido (**1** - DMSO [6] +SAC [0,2]; **2** - GLI [5] +SAC [0,2]; **3** - PROP [5] + DMSO [5]; **4** - ET [P]; **5** - GLI [P];), de acordo com SHAW et al. (2000), forma-se um líquido extremamente viscoso que impede a nucleação de cristais de gelo, fazendo com que a parte sólida mantenha a sua estrutura molecular e a sua concentração iônica, semelhante a sua fração líquida. Diferentes crioprotetores demonstram diferentes tendências à formação vítrea, baseado em uma equivalência molar específica; desta forma, a concentração exigida é específica do produto como o DMSO que só forma uma solução vítrea nas concentrações acima de 5M, enquanto que o propileno glicol 4 M, glicerol 5 M, acetamida 7 M, e o metanol 10 M (ZANG; RAWSON, 1998).

De acordo com Takahashi (1978) e Mc-Niven et al.(1993) as técnicas de vitrificação necessitam de uma alta concentração de crioprotetores, contudo o seu excesso torna-se deletério ao desenvolvimento embrionário; o que nos levou a descartar dentre as cinco soluções vitrificadas em nossos testes, o glicerol e o etileno glicol. Entretanto, quando as concentrações destas soluções são demasiadamente baixas, elas não apresentam resultados observáveis quanto a sua função crioprotetora. Zang e Rawson (1996) demonstraram que o DMSO, metanol e o propileno glicol no estágio de seis somitos só apresentam uma vitrificação em soluções com concentrações acima de 2 M, enquanto que o etileno glicol 1 M e o glicerol 0,5 M.

As outras três soluções testadas (**1** - DMSO [6] +SAC [0,2]; **2** - GLI [5] +SAC [0,2]; **3** - PROP [5] + DMSO [5]) apresentaram resultados semelhantes às soluções puras, contudo, em uma concentração consideravelmente menor. Os resultados corroboram com o descrito por Robles et al. (2003), que apontam o uso de associações de crioprotetores internos e externos, como uma possibilidade para obter uma solução que possibilita abaixar seu ponto crioscópico abaixo de 0°C, “saltando” assim a faixa de nucleação de cristais de gelo, prolongando o tempo de supercooling.

Das três soluções que vitrificaram a selecionada foi a que utilizou como crioprotetores internos propileno glicol (PROP) associado ao dimetil sulfóxido (DMSO), descritos na literatura como sendo os crioprotetores menos tóxicos (ZANG; RAWSON, 1996). Junto aos dois crioprotetores, adicionamos a Sacarose (SAC), pois como sugere Routray et al. (2002), enquanto os crioprotetores internos difundem-se através das membranas celulares e a protegem da formação interna do gelo, a SAC promove a estabilização externa da membrana do embrião e suplementa o controle da nucleação de gelo. A sacarose normalmente é utilizada como um crioprotetor externo, entendendo-se que por ser um dissacarídeo, formado por uma molécula de frutose e uma de glicose, apresenta melhores resultados que os monossacarídeos, como a própria glicose (NEVES et al., 2012; ZANG; RAWSON, 1996).

Durante os processos de crioconservação, os crioprotetores detêm a função de retirar a água presente no interior do material biológico por diferença de osmolaridade e tomar o seu lugar, sendo esse processo dependente do tamanho da molécula do crioprotetor e da temperatura em que foi empregada (PALASZ et al., 2000; ZANG; RAWSON, 1996). Contudo, esse equilíbrio demora algum tempo, o que na vitrificação é reduzido devido à alta curva de resfriamento do material biológico, resultando em uma desidratação não eficiente, o que facilita a nucleação de grandes cristais de gelo. Contudo, o uso de um aumento gradativo na osmolaridade das soluções além de evitar um choque osmótico embrionário, permite o influxo e efluxo eficiente do crioprotetor e da água, respectivamente (POLGE; WILLADSEN, 1978; ROBLES et al., 2003; STOSS; DONALDSON, 1982).

A maior exposição dos embriões ao PROP vislumbrava atingir uma alta concentração interna do crioprotetor junto a uma baixa hidratação celular (ROBLES et al., 2003). Ao final do processo, realizou-se a associação do PROP com o DMSO e a SAC, objetivando controlar o ponto de nucleação dos cristais de gelo e proteger as membranas externas do embrião, uma vez que não existiria mais um tempo hábil para uma grande taxa de difusão do DMSO. O tempo em que o embrião permanece imerso na solução pode apresentar um grande problema no processo, pois ao desidratar o embrião sua concentração iônica interna é aumentada, sendo descrito como nociva às células. Desta forma, torna-se necessário encontrar uma forma em que possa empregar uma menor concentração de crioprotetores possível em uma fase de desenvolvimento embrionário menos sensível às baixas temperaturas e adequar o tempo de congelamento.

Assim como a curva de congelamento é de extrema importância no processo de vitrificação, o retorno para o descongelamento também o é. Contudo, ao ser vitrificado, o embrião é diretamente mergulhado no nitrogênio líquido atingindo acentuadas curvas de resfriamento, mas a curva de retorno, para o descongelamento, esta não consegue ser alcançada e conseqüentemente ao passar pela faixa de temperatura de -40°C e 0°C, ocorrendo o crescimento dos pequenos cristais de gelo existente em um fenômeno conhecido como regelo (ROBLES et al., 2003). Com a formação dos cristais nas estruturas internas embrionárias, suas membranas são rompidas pelas pontas dos cristais culminando na morte do embrião (ASAHINA; TAKAHASHI, 1978). Polge e Willadsen (1978) destacaram que um descongelamento rápido geralmente gera mais danos aos embriões de animais de produção, que o descongelamento lento, pois esse tipo de processo afetaria a reidratação do embrião impedindo a retomada de seu desenvolvimento embrionário. Associado ao tempo de descongelamento, o volume das palhetas também influencia a tendência de crescimento dos cristais de gelo, sendo considerado que as soluções se comportam de forma mais estável em palhetas com volumes menores que 0,5ml (ASAHINA; TAKAHASHI, 1978; CABRITA et al., 1999; ZANG; RAWSON, 1996).

Poucos protocolos exibiram resultados positivos após a vitrificação, sendo que, os embriões de Zebrafish submetidos à vitrificação com propileno glicol (PROP) apresentaram 32% de embriões viáveis pós-descongelamento, contudo 15 minutos após a diluição do crioprotetor eles apresentaram o colapso da membrana vitelínica e a ruptura do vitelo (ZANG; RAWSON, 1996). Os embriões de linguado (*Scophthalmus maximus*), criopreservado com uma associação de crioprotetores (dimetil sulfoxido, etilenoglicol, metanol e sacarose) dispostos em uma série crescente de osmolaridade e vitrificados em palhetas de 0,25ml, apresentaram 49% de sua morfologia intacta, contudo 8 horas após o descongelamento eles apresentavam diferentes graus de degeneração e uma coloração completamente branca, sem nenhum desenvolvimento embrionário (ROBLES et al., 2003). Corroborando com a regra descrita na literatura, os embriões de *Prochilodus lineatus* não resistiram ao processo de vitrificação, sendo que após o descongelamento, eles não apresentavam as características morfológicas externas das fases embrionárias, como os somitos bem definidos, vesícula óptica e ótica em formação; além disso, foi possível visualizar em sua epiderme regiões circulares delimitadas por restos epidérmicos, o que provavelmente foram bolhas originadas por queimaduras promovidas pelo nitrogênio líquido. Transcorridos cinco minutos, os embriões começavam a se desfazer, provavelmente, essas alterações são provocadas pela destruição de suas estruturas internas causadas pelos cristais de gelo.

Durante a criopreservação, inúmeras estruturas são alteradas pela nucleação dos cristais de gelo, que visualmente, pode ser verificado pelo branqueamento das palhetas na região dos embriões. Em nosso trabalho, os cristais de gelo se formaram durante a tentativa de descongelar o material, sendo que, durante a hidratação, o embrião apresentou um inchaço seguido por uma deterioração de suas estruturas, semelhante ao descrito por Neves et al. (2012), que descreveu a formação de gelo antes do processo de hidratação do material e por Ninhaus et al., (2008). Pegg e Rubinsky, (1988) descreveram injurias promovida pela nucleação de cristais de gelo com sinusoidais hepáticos, verificando a presença de cristais de gelo de 5 a 7 μm e outros cristais menores presentes nos tecidos a sua volta promovendo a ruptura da tensão tecidual e consequentemente danificando o tecido congelado.

3.6 CONCLUSÕES

- Assim, concluiu-se que apesar de se obter uma vitrificação efetiva dos embriões de *P. lineatus* através das soluções DMSO [6] +SAC [0,2]; GLI [5] +SAC [0,2] e PROP [5] + DMSO [5], não foi possível impedir a formação dos cristais de gelo, que promoveram a quebra na coesão tecidual formando espaços entre as células e entre os glóbulos de vitelo, formação de protuberâncias na superfície embrionária e perda dos caracteres morfológicos presentes nos estágios embrionários como vesículas ópticas, óticas e somitos, formando assim uma massa celular disforme que logo após a desvitrificação se desfazia inviabilizando o desenvolvimento embrionário.

3.7 REFERÊNCIAS

ASAHINA, E.; TAKAHASHI, T. Freezing tolerance in embryos and spermatozoa of the sea urchin. **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 15, n. 1, p. 122-127, Feb. 1978.

CABRITA, E.; ROBLES, V.; REAL, M.; ÁLVAREZ, R.; HERRAÉZ, M. P. Effect of different permeabilization agents on the penetration of DMSO in turbot embryos. **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 39, p. 346, 1999.

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. **Conservação de recursos genético de peixes: teoria e prática**. Tradução de H. P. Godinho. Victoria: World Fisheries Trust, 1999. Curso de treinamento brasileiro.

HOWARD, F. H.; OTTO, A. G. Cryopreservation of fish spermatozoa and ova. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 33, n. 4, p. 995-1000, 1 Jan. 1976.

HAGEDORN, M.; HSU, E. W.; PILATUS, U.; WILDT, D. E.; RALI, W. F.; BLACKBAND, S. J. Magnetic resonance microscopy and spectroscopy reveal kinetics of cryoprotectant permeation in a multicompartamental biological system. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, DC, v. 93, n. 15, p. 7454-7459, 23 July 1996.

HAGEDORN, M.; KLEINHANS, E. W.; ARTEMOV, D.; PILATUS, U. Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 59, n. 5, p. 1240-1250, Nov. 1998.

HAGEDORN, M.; KLEINHANS, E. W.; WILDT, D. E.; RALL, W. E. Chilling sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 34, n. 3, p. 251-263, May 1997.

HAGEDORN, M.; LANCE, S. L.; FONSECA, D. M.; KLEINHANS, F. W.; ARTEMOV, D.; FLEISCHER, R.; HOQUE, A. T. M. S.; HAMILTON, M. B.; PUKAHENTHI, B. S. Altering fish embryos with aquaporin-3: an essential step toward successful cryopreservation. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 67, n. 3, p. 961-966, 2002.

HAGEDORN, M.; KLEINHANS, F. W.; MAZUR, P. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option. **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 49, n. 2, p. 181-189, Oct. 2004.

JARAMILLO, R.; GOICOECHEA, O.; GARRIDO, O.; MOLINARI, E. Caracterización electroforética de las proteínas del corion normal y del corion duro de salmo salar. **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 44, p. 59-65, 1 jan. 2012.

MCNIVEN, M. A.; CALLANT, R. K.; RICHARDSON, G. F. Dimethyl acetamide as a cryoprotectant for rainbow trout spermatozoa. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 40, n. 5, p. 943-948, Nov. 1993.

NEVES, P. R. **Utilização de crioprotetores intra e extracelulares em embriões de pacu (*Piaractus mesopotâmicus*)**. 2008. 71 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.

NEVES, P. R.; RIBEIRO, R. P.; STREIT-JR, D. P. Injuries in pacu embryos (*Piaractus mesopotamicus*) after freezing and thawing. **Zygote**, Cambridge, FirstView Article, p. 1-7, July 2012.

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 35, n. 1, p.109-123, Jan. 1991.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A., CLAUDI, A. A., VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Cryogenic preservation of embryos of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote**, Cambridge, v. 17, n. 1, p. 45-55, 2008.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Cryopreservation of trout semen: diluent, straw and vapor column. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 135-139, 23 abr. 2003.

NINHAUS-SILVEIRA, A. Preservação de gametas de peixes e suas aplicações. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**, Medellín, v. 20, n. 4, p. 516-517, 2007.

NINHAUS-SILVERIA, A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; SENHORINI, J. A.; ALEXANDRE, J. S.; CHAGURI, M. P. Fertilidade do sêmen de Matrinxã (*Brycon amazonicus*) criopreservado em nitrogênio líquido. **Boletim Técnico Do Cepta**, Pirassununga, v. 19, p. 1-8, 2006.

PALASZ, A. T.; THUNDATHIL, J.; FUENTE, J. de La. Effect of reduced concentration of glicerol and various macromolecules on the cryopreservation of mouse and cattle embryos. **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 41, n. 1, p. 35-42, Aug. 2000.

POLGE, C.; WILLQADSEN, S. M. Freezig eggs of farms animals. **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 15, n. 3, p. 370-373, 1 Jan. 1978.

ROBLES V.; CABRITA, E.; FLETCHER, G. L.; SHEARS, M. A.; KING, M. J.; HÉRRAEZ, M. P. Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 64, n. 7, p. 1633-1646, 15 Oct. 2005.

ROBLES V.; CABRITA, E.; REAL, M.; ÁLVAREZ, R.; HÉRRÁEZ, M. P. Vitrification of turbot embryos: preliminary assays. **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 47, n. 1, p. 30-39, Aug. 2003.

ROBLES, V.; CABRITA, E.; ACKER, J. P. Embryo cryopreservation: what we know until now. In: CABRITA, E.; ROBBLES, V.; HERRÁEZ, P. (Comp.). **Methods in Reproductive Aquaculture**. New York: Taylor & Francis, 2009. Cap. 9, p. 265-294.

ROBLES, V.; CABRITA, E.; PAZ, P.; CUÑADO, S.; ANEL, L.; HERRÁEZ, M. P. Effect of a vitrification protocol on the lactate dehydrogenase and glucose-6-phosphatase dehydrogenase activities and the hatching rates of Zebrafish (*Danio rerio*) and turbot (*Scophthantalmus maximus*) embryos. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 61, n. 7/8, p.1367-1379, 5 Aug. 2004.

ROUTRAY, P.; SUZUKI, T.; AUGUSTO, C. Factors affecting the uptake of DMSO by the eggs and embryos of medaka, *Oryzas latipes*. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 58, n. 8, p. 1483-1496, Nov. 2002.

RUBINSKY, B.; PEGG, D. E. A mathematical model for the freezing process in biological tissue. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B**, London, v. 243, n. 1276, p. 343-358, 23 Aug. 1988.

SCHNEIDERB, U.; MAZUR, P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 21, n. 1, p. 68-79, Jan. 1984.

SEREAN, L.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. The effect of external medium composition on membrane water permeability of zebrafish (*danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 64, n. 7, p. 1591-1602, 15 Oct. 2005.

SHAW, J. M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 53, n. 1, p. 59-72, 1 jan. 2000.

STOSS, J.; DONALDSON, E. M. Studies on cryopreservation of eggs from rainbow trout (*salmo gairdineri*) and coho salmon (*oncorhynchus kisutch*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 51-65, Feb. 1983.

SUZUKI, M.; ISHIKAWA, M.; AKIHAMA, T. Cryopreservation of encapsulated gentian axillary buds following 2 step-preculture with sucrose and desiccation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 83, n. 1, p. 115-121, Oct. 2005.

SUZUKI, T.; KOMADA, H.; TAKAI, R.; KEIJI, A.; KOZIMA, T. T. Relation between toxicity of cryoprotectant DMSO and its concentration in several fish embryos. **Fisheries Science**, Tokyo, v. 61, n. 2, p.193-197, 3 Mar. 1995.

ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Feasibility studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 33, n. 1, p. 1-13, Feb. 1996.

ZHANG, T. T.; RAWSON, D. M. Permeability of dechorionated one-cell and 6-somite stage zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos to water and methanol. **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 37, n. 1, p. 13-21, Aug. 1998.

ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Studies on chilling sensitivity of Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Embryos. **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 32, n. 3, p. 239-246, 1995.

4 CONCLUSÃO GERAL

A crioconservação de embriões de peixes neotropicais necessita de estudos específicos quanto aos efeitos deletérios das substâncias crioprotetoras empregadas e das temperaturas necessárias para a sua realização; não sendo possível, através dos protocolos avaliados, preservar as características morfo-fisiológicas dos embriões de *Prochilodus lineatus*.

APÊNDICES

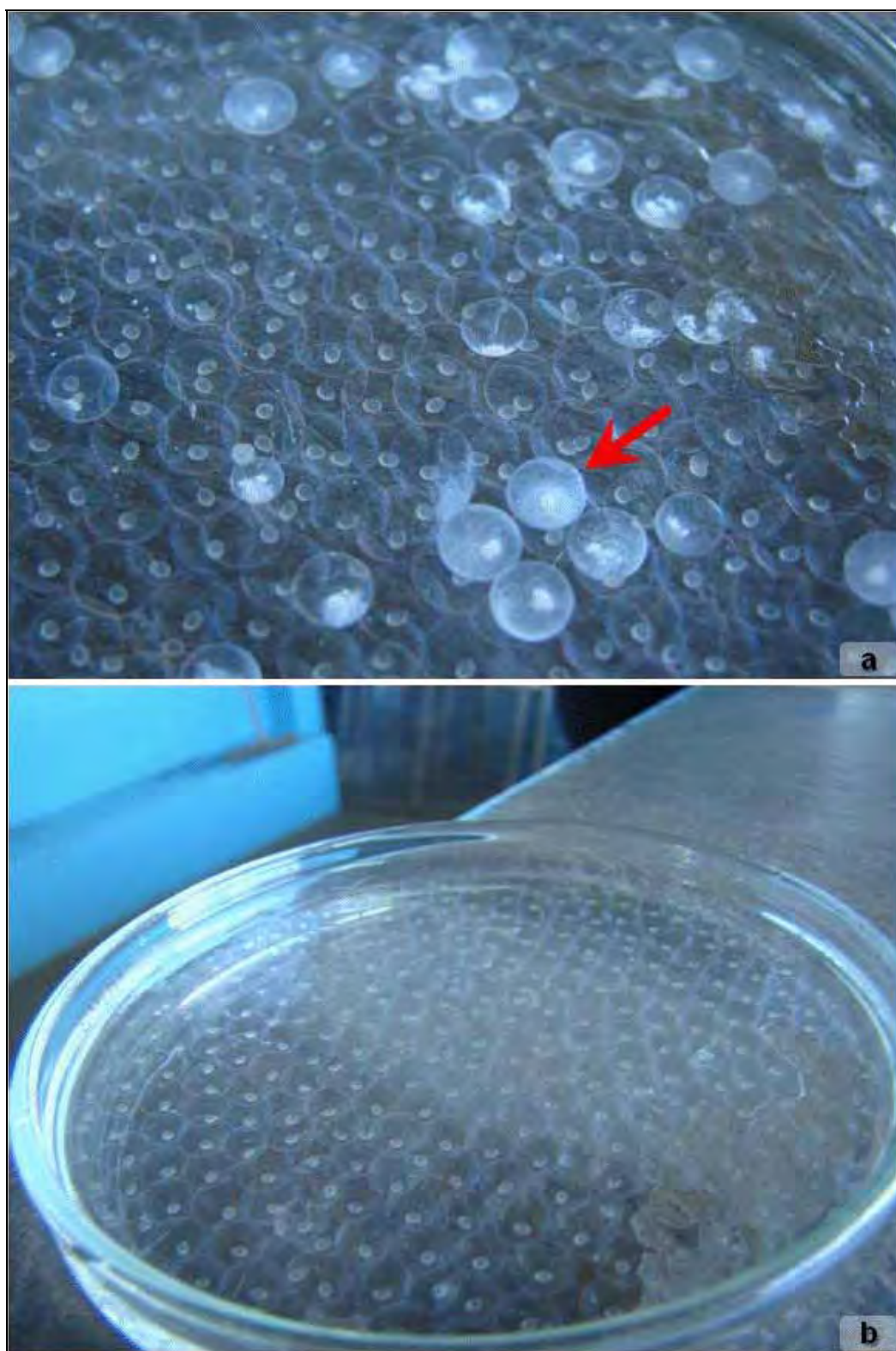
APÊNDICE A – ILUSTRAÇÕES METODOLÓGICAS

Figura 32 - Reprodução do *Prochilodus lineatus*.



Legenda: a - extrusão dos oócitos; b - espermição; c – mistura a seco de oócitos e sêmen; d - ativação dos espermatozoides e hidratação. **Fonte:** Elaboração do próprio autor.

Figura 33 - Embriões de *Prochilodus lineatus*.



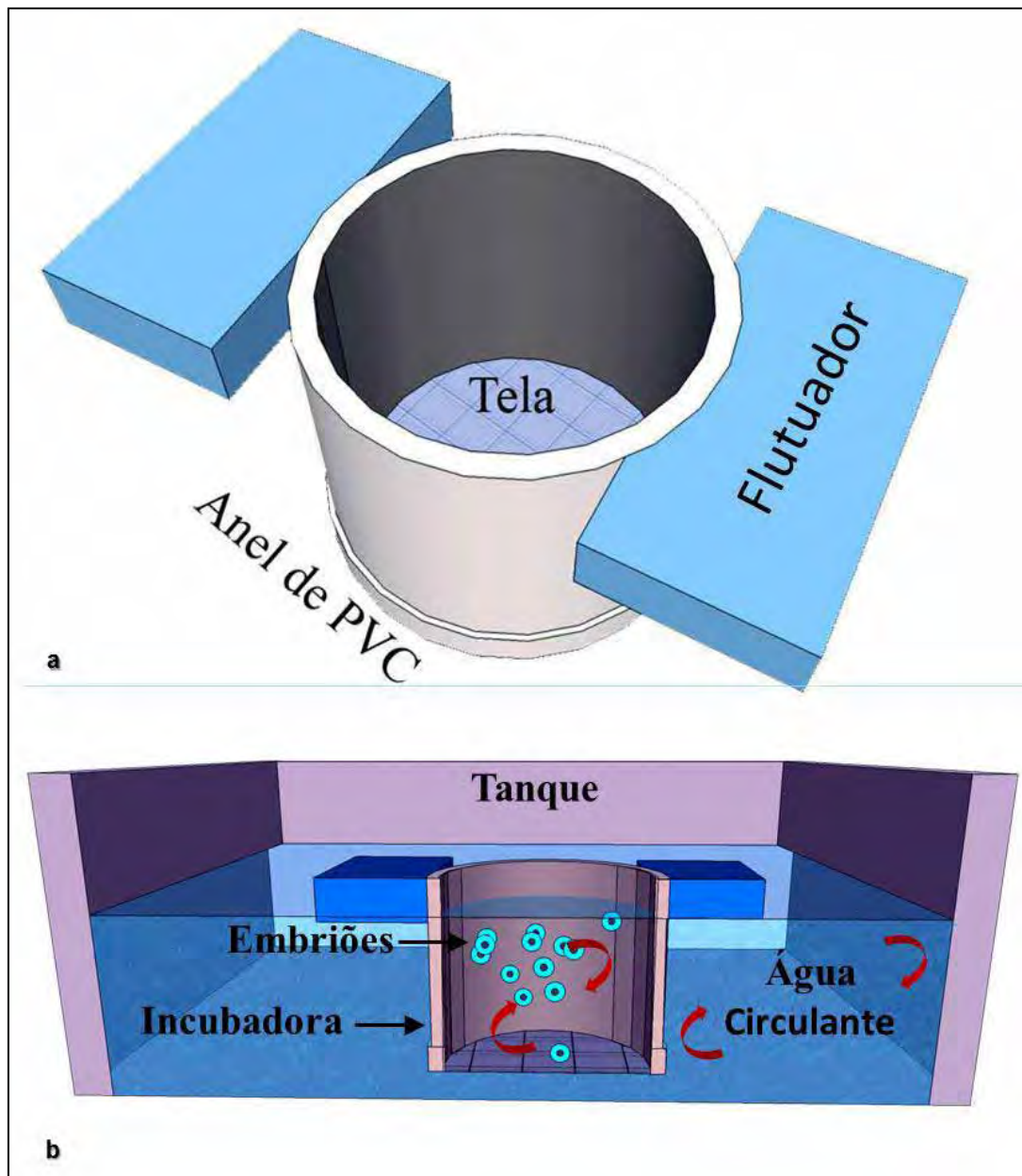
Legenda: **a** - Embriões mortos (seta vermelha); **b**- Embriões selecionados com desenvolvimento normal. **Fonte:** Elaboração do próprio autor.

Figura 34- Padrão de uma amostra (139 ± 11 embriões).



Fonte: Elaboração do próprio autor.

Figura 35- Incubadoras-PVC.



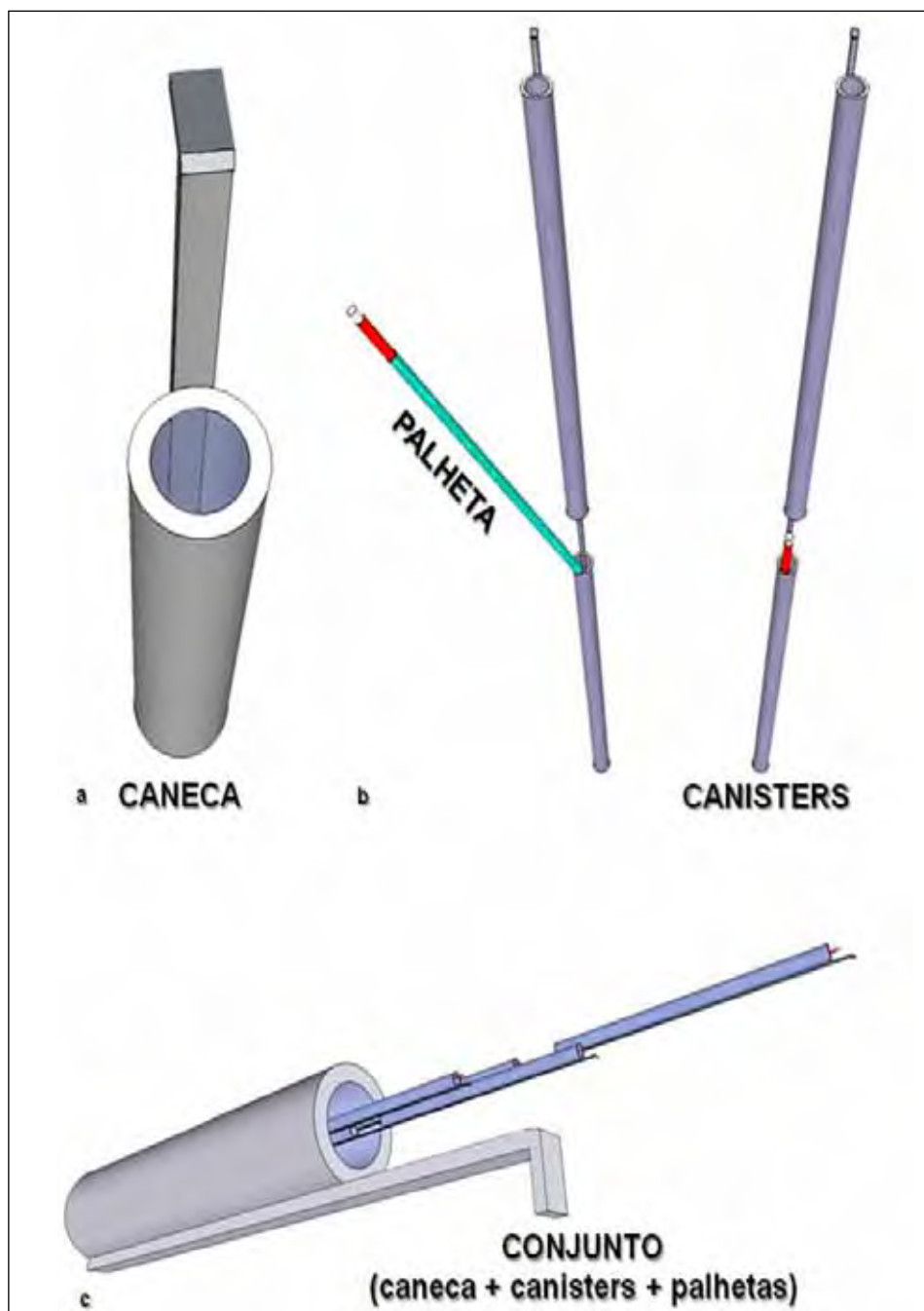
Legenda: a - componentes da incubadora-PVC; b - Corte do plano longitudinal da utilização da incubadora. **Fonte:** Elaboração do próprio autor.

Figura 36 - Etapas do teste de toxicidade.



Fonte: Elaboração do próprio autor.

Figura 37 - Conjunto para acondicionar os embriões em tanques de nitrogênio.



Legenda: **a** - caneca; **b**- palhetas sendo acondicionadas nos canisters; **c**- conjunto de caneca + canisters + palhetas, pronto para ser mergulhado no tambor de nitrogênio. **Fonte:** Elaboração do próprio autor.

Figura 38 - Etapa de envase dos embriões em palhetas criogênicas e imersão em nitrogênio líquido.



Legenda: **a** - palheta pronta para aspirar aos embriões; **b** - imersão das palhetas em nitrogênio; **c** - acondicionando os canisters em canecas já armazenadas nos botijões de nitrogênio. **d** – botijões MVE de nitrogênio. **Fonte:** Elaboração do próprio autor.

APÊNDICE B – COLORAÇÕES

Apêndice B. 1- Azul Toluidina:

- *Lavar os cortes rapidamente em água filtrada;*
- *Azul Toluidina 0,2% pH 5,6 por 15';*
- *Lavar bem com água filtrada até retirar o excesso de corante;*
- *Álcool 90% por 5";*
- *Álcool absoluto I por 5";*
- *Álcool absoluto II por 5";*
- *Álcool absoluto III por 5";*
- *Álcool + xilol por 5";*
- *Xilol I por 5";*
- *Xilol II por 5";*
- *Xilol III para montagem;*
- *Montar em Permunt.*

Resultado: Metacromasia (alteração da coloração de azul para lilás na presença de polissacarídeos ácidos).

Apêndice B. 2 - Hematoxilina / Eosina:

- *Hidratar os cortes em água corrente;*
- *Hematoxilina de 15 a 20';*
- *Lavar em água corrente por 10'*
- *Desidratar em álcool 90% (se a eosina for alcoólica);*
- *Eosina de 10 a 15';*
- *Lavar bem em água corrente;*
- *Álcool 70% por 5";*
- *Álcool 80% por 5";*
- *Álcool 95% por 5";*
- *Álcool absoluto por 5"(2x);*
- *Xilol I por 5";*
- *Xilol II por 5";*
- *Xilol III para montagem;*
- *Montar em Permount.*

Apêndice B. 3 - Periodic Acid Schiff (P.A.S):

- *Passar em álcool 90%;*
- *Hidratar em água corrente;*
- *Tratar em ácido Periódico á 1% por 15';*
- *Lavar em água corrente por 5';*
- *Deixar em Reativo de Schiff por 40';*
- *Lavar por 10';*
- *Contra corar com Hematoxilina de Harris por 7';*
- *Álcool 70% por 5";*
- *Álcool 80% por 5";*
- *Álcool 95% por 5";*
- *Álcool absoluto por 5"(2x);*
- *Xilol I por 5";*
- *Xilol II por 5";*
- *Xilol III para montagem;*
- *Montar em Permount.*

Resultado: polissacarídeos neutros como amido, celulose e glicogênio, além de glicoproteínas coram em magenta.

Apêndice B. 4 - Hematoxilina:

- *Hidratar os cortes em água;*
- *Hematoxilina de 15 a 20 segundos;*
- *Lavar em água corrente até retirar o excesso de corante;*
- *Diferenciador (Ácido Clorídrico-HCl) até atingir a coloração desejada;*
- *Lavar bem em água corrente;*

OBS: Coloração para observar estruturas externas de embriões sob estereomicroscópio; desta forma, o processo todo é realizado dentro de um tubo de ensaio, com o auxílio de uma pipeta descartável para proceder as lavagens em água.

Apêndice B. 5 - Metanil Yellow:

- *Passar os cortes em álcool 90%;*
- *Hidratar em água destilada;*
- *Ac. Periódico 1% por 10';*
- *Lavar em água destilada por 5';*
- *Reativo de Schiff por 1 hora (manter na geladeira);*
- *Lavar em água destilada por 10';*
- *Hematoxilina Férrica por 6';*
- *Lavar em água destilada por 10';*
- *Metanil Yellow por 2';*
- *Lavar em água destilada;*
- *Desidratação em álcool;*
- *Montagem.*