

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE ENGENHARIA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
Douglas de Castro Ribeiro

**CRIOPRESERVAÇÃO DE OÓCITOS DE *Prochilodus*
lineatus (VALENCIENNES, 1836) (TELEOSTEI,
PROCHILODONTIDAE)**

Ilha Solteira
2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE ENGENHARIA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
Douglas de Castro Ribeiro

**CRIOPRESERVAÇÃO DE OÓCITOS DE *Prochilodus*
lineatus (VALENCIENNES, 1836) (TELEOSTEI,
PROCHILODONTIDAE)**

Prof. Dr. Alexandre Ninhaus Silveira
Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia – Unesp, Campus de Ilha Solteira, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal. Especialidade: Sistema de Produção.

Ilha Solteira

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

R484c Ribeiro, Douglas de Castro.
Criopreservação de oócitos de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836)
(Teleostei, Prochilodontidae / Douglas de Castro Ribeiro. -- Ilha Solteira: [s.n.],
2015
51 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de
Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Produção Animal, 2015

Orientador: Alexandre Ninhaus Silveira
Inclui bibliografia

1. Biotecnologia. 2. Crio-injúrias. 3. Congelamento lento. 4. Peixes
neotropicais. 5. Histologia.



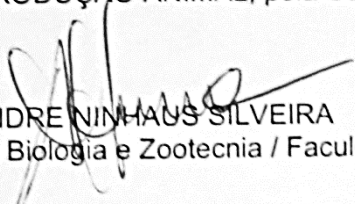
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Criopreservação de Oócitos de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836)

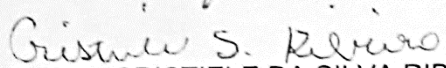
AUTOR: DOUGLAS DE CASTRO RIBEIRO

ORIENTADOR: Prof. Dr. ALEXANDRE NINHAUS SILVEIRA

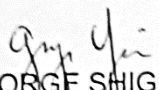
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal, Área: PRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. ALEXANDRE NINHAUS SILVEIRA

Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira


Profa. Dra. CRISTIELE DA SILVA RIBEIRO

Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira


Prof. Dr. GEORGE SHIGUEKI YASUI

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de Pirassununga

Data da realização: 20 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Alexandre Ninhaus Silveira pela disponibilidade e generosidade de ter aceitado ser meu orientador, e por ter aberto espaço em sua vida para contribuir com minha formação.

A professora Rosicleire, colegas e amigos do Laboratório de Ictiologia Neotropical - L.I.NEO., pela amizade, apoio e paciência durante os três anos de convivência. Aos meus familiares mesmo estando longe, estão bem perto.

Aos amigos Cristiane Bashiyo, Raphael Costa e Fabrício Marçal pela ajuda e incentivo nas duras e longas noites perdidas de sono durante os trabalhos de campo, sem eles nada teria acontecido, meus sinceros agradecimentos.

A Jumma Miranda pelo apoio moral e amigo ao longo destes anos em que estamos juntos.

Aos Professores Igor Paiva, Cristiële Ribeiro e George Yasui, por ter aceitado o convite para participar da banca e as valiosas sugestões durante as etapas finais.

Ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais - CEPIS/ICMBIO, em fornecer suas instalações e os animais e para a confecção deste trabalho, Noel, Gordo Carla, Rita, a “tia do café”... em especial ao Dr. José A. Senhorini por compartilhar suas experiências profissionais e pessoais.

A toda equipe da CEMIG MG/OE, João Lopes, Alessandra, Caissor, Sônia, Edmundo, pelo suporte técnico e incentivo durante minha passagem pela Estação Ambiental de Volta Grande.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-Fapesp, pelo suporte financeiro (processo n° 2013/10807-9), que sem ela esta obra não seria possível.

Enfim, a todas as pessoas que participaram diretamente ou não nesta etapa de minha vida, muito obrigado a todos!

"Man in his arrogance thinks of himself as a great work, worthy of the intervention of a deity."

(Charles Darwin)

RESUMO

A décadas a criobiologia busca a conservação do genoma materno em peixes por meio da conservação de gametas, porém as técnicas disponíveis atualmente esbarram em problemas como a baixa permeabilidade das membranas, o grande volume de vitelo e a sensibilidade dos gametas ao frio. Trabalhos acerca do assunto vem sendo realizados, contudo de forma não sistemática e de forma majoritária com espécies de clima temperado a frio. Devido a carência de informações sobre o tema com peixes neotropicais, objetivou-se neste trabalho desenvolver um protocolo para o congelamento de oócitos de *Prochilodus lineatus*, para isso, foi avaliado o uso de diferentes soluções salinas (solução de Ringer e Ringer lactato, solução salina balanceada de Hank (HBSS) com e sem cálcio, e solução para ovos de salmonídeos) como meio de manutenção e extensão da viabilidade dos oócitos. Também foi avaliado a toxicidade de três agentes crioprotetores (ACPs) o Dimetilsulfóxido (DMSO), Propilenoglicol (PG), e Metanol (MET), visando (1) a elaboração de protocolos de vitrificação, com exposição de 2,5, 5 e 7,5 min. em molaridades de 6 M, 8 M e 10 M de ACP; e (2) para a construção de protocolos de congelamento lento com incorporação dos ACPs em banhos crescentes avaliado os efeitos tóxicos sobre a fertilização em 0,5 M, 1 M, 2 M e 4 M. Avaliou-se a sensibilidade dos oócitos a baixa temperatura (2,5°C) em quatro tempos de estocagem 30, 60, 90 e 120 minutos. Oócitos foram submetidos ao congelamento lento em vapor de nitrogênio avaliando as injúrias morfológicas geradas pela exposição aos ACPs e ao congelamento. Os resultados obtidos mostraram que somente a HBSS com e sem cálcio foram capazes de manter o estado não ativado dos gametas, porém, as mesmas não proporcionaram a extensão da viabilidade dos oócitos, permitindo a que estes continuassem a sofrer a degradação pelo tempo de estocagem, de forma similar aos oócitos mantidos somente em fluido ovariano. Foi constatado a alta sensibilidade dos oócitos aos ACPs e ao frio. A toxicidade apresentada nas molaridades mais altas dos ACPs (6 M, 8 M e 10 M) em todos os tempos de exposição, inviabiliza o congelamento por vitrificação. Foi observado certa toxicidade em molaridades mais baixas (0,5, 1, 2 e 4 M), contudo foi possível obter taxas de viabilidade que permitem a exploração novos protocolos de congelamento lento. Injúrias foram observadas durante a exposição aos ACPs e após o descongelamento dos oócitos, entretanto os mesmos apresentaram capacidade de hidratação de forma aparentemente normal. Hipóteses foram levantadas sobre as etapas em que ocorrem os maiores danos nos oócitos e sugestões foram apresentadas sobre novas avaliações.

Palavras-chave: Biotecnologia. Crio-injúrias. Congelamento lento. Peixes Neotropicais. Histologia.

ABSTRACT

The decades cryobiology seeks to conserve the maternal genome in fish through gamete preservation, but the techniques currently available run into problems such as low permeability of the membranes, the large the amount of yolk and the sensitivity of gametes to cold. Work on the subject has been carried out, however unsystematically and majority form with cold temperate species. Due to lack of information on the subject with Neotropical fish, the aim of this work is to develop a protocol for the freezing of *Prochilodus lineatus* oocytes for this, was evaluated using different salt solutions (Ringer and Ringer's lactate solution, Hank's balanced salt solutions (HBSS) with and without calcium, and the solution for salmonid eggs) as a means of maintaining and extending the viability of oocytes. We also assessed the toxicity of three cryoprotectants agents (ACPs) the Dimethyl sulfoxide (DMSO), Propylene glycol (PG), and Methanol (MET), to (1) the development of vitrification protocols with exposure, 2.5, 5.0 and 7.5 min. in molarities the 6 M 8 M 10 M CPA; and (2) for the construction of slow cooling protocols with CPAs with increasing incorporation of the baths evaluated toxic effects on fertility in 0.5 M, 1 M, 2 M and 4 M. It was evaluated the lower the sensitivity of oocytes temperature (2.5 ° C) storage on four 30, 60, 90 and 120 minutes. Oocytes underwent slow cooling in nitrogen steam evaluating the morphological injuries due to exposure to the CPAs and freezing. The results showed that only with HBSS without calcium and were able to maintain the state of gametes not activated, however, they do not provide the extent of viability of oocytes, allowing that they continue to suffer from degradation by storage time, similarly to the oocytes retained only in ovarian fluid. The high sensitivity of oocytes to the CPAs and the cold was found. The toxicity of the higher molarities of CPAs (6 M, 8 M and 10 M) at all exposure times, precludes freezing for vitrification. Some toxicity was observed at lower molarities (0.5 M, 1 M, 2 M and 4 M), but was possible to obtain viability rates used to open new slow freezing protocols. Injuries were observed during exposure to CPAs and after thawing of oocytes, however they showed hydration capacity of apparently normal. Hypotheses have been raised about the steps that occur in the greatest damage in oocytes and suggestions have been made on new reviews.

Keywords: Biotechnology. Cryo-injuries. Slow cooling. Neotropical fishes. Histology.

Sumário

	Página
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1 Os oócitos de peixes Neotropicais.....	10
2.2 Congelamento de oócitos de peixes.....	12
2.3 O Curimbatá (<i>Prochilodus lineatus</i>).....	14
3. OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo geral	16
3.2 Objetivos específicos	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Manutenção dos animais e obtenção dos oócitos	17
4.2 Escolhas das soluções salinas.....	17
4.3 Toxicidade dos agentes crioprotetores.....	18
4.4 Sensibilidade ao frio.....	19
4.5 Procedimentos de congelamento e descongelamento.....	20
4.6 Avaliação morfofisiológica	20
4.7 Estatística e análise dos dados	21
5. RESULTADOS	22
5.1 Hidratação, ativação cortical e morfologia dos oócitos.....	22
5.2 Teste de Fertilização.....	22
5.3 Sensibilidade aos agentes crioprotetores.....	23
5.4 Sensibilidade a baixa temperatura.....	23
5.5 Injúrias geradas pelo congelamento.....	24
6. FIGURAS.....	25
7. DISCUSSÃO	37
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
9. REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

O impacto gerado pela ação antrópica nas últimas décadas sobre a diversidade de peixes de água doce e marinha é incontestável. Isso reflete no declínio das populações naturais deste grupo, redução esta que pode ter graves consequências sócioeconômicas e ecológicas. A velocidade com que a redução destes recursos vem acontecendo implica na necessidade cada vez maior do desenvolvimento de novas biotecnologias para atenuar esses efeitos (ROBERTS et al., 2002).

Uma das técnicas mais promissoras dentre as metodologias para a preservação e manutenção dos recursos ictiogenéticos é a criopreservação (DINNYÉS et al., 1998). O termo é utilizado para descrever a técnica de congelamento de material biológico como tecidos, células, embriões e outros, por tempo indeterminado, a temperaturas extremamente baixas (-196°C) e que, quando o mesmo for descongelado mantenha sua viabilidade normal (GWO; STRAWN; ARNOLD, 1995; ZHANG; TIAN TIAN; RAWSON, 2007).

Os trabalhos pioneiros aplicados para peixes buscavam somente prolongar a viabilidade dos gametas de forma não congelada, mas por resfriamento em temperaturas próximas de 0°C (WALTERS et al., 2009). Posteriormente, as pesquisas tiveram foco no desenvolvimento de técnicas de congelamento profundo em nitrogênio líquido, que preservassem a integridade e a viabilidade dos gametas (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008).

A técnica de criopreservação de gametas baseia-se em cinco procedimentos básicos: 1) a exposição a um ACP e/ou soluções crioprotetoras (SCPs); 2) a aplicação de uma curva de resfriamento até o total congelamento do material; 3) estocagem do material em lugares apropriados; 4) o descongelamento do material, por meio de uma curva de aquecimento que evite a recristalização de gelo e; 5) a remoção dos ACPs (CASTRO et al., 2011).

Protocolos de criopreservação para gametas, tecidos e embriões de peixes são, em sua maioria, referentes a animais de clima temperado como Salmonídeos e Cyprinídeos (RANA; GILMOUR, 1996; GUAN et al., 2008c, 2010). Grande parte dos protocolos sobre criopreservação de gametas

disponíveis na literatura que foram efetivamente comprovados abordam congelamento de sêmen (GODINHO; VIVEIROS, 2011; VIVEIROS et al., 2011), quando se refere à criopreservação de oócitos e embriões de teleósteos Neotropicais, a situação é mais delicada, protocolos com resultados positivos no congelamento e descongelamento deste tipo de material biológico são escassos e realizados de forma não sistemática (HAGEDORN; HSU; KLEINHANS; et al., 1997; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008; GUAN et al., 2010; STREIT-JR et al., 2014).

A determinação da concentração efetiva dos ACPs que impeça a formação de cristais de gelo intracelular, não afetando a viabilidade do material, é primordial para a aplicação da técnica de congelamento (SUZUKI et al., 1994). Dada a toxicidade dos ACPs para células e estruturas mais complexas como os embriões, a combinação inapropriada pode acarretar diversas injúrias durante a criopreservação (ROBLES et al., 2004), deste modo, ensaios de toxicidade e avaliações sobre os danos causados durante o processo de congelamento consistem nos primeiros passos para o sucesso da criopreservação, principalmente na vitrificação em que obrigatoriamente necessita de protocolos com altas concentrações de ACPs (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008; ROBLES et al., 2004; STOSS; DONALDSON, 1983; ZHANG; RAWSON, 1995).

Além dos problemas encontrados acerca da interação com os ACPs (estresse osmóticos e toxicidade), existe o problema da sensibilidade dos peixes às baixas temperaturas (POLGE; WILLADSEN, 1978). Os peixes neotropicais estão adaptados a ambientes com temperaturas relativamente altas, assim, de modo geral, seus gametas e embriões apresentam uma alta sensibilidade a baixas temperaturas, acarretando injúrias aos gametas e morte dos embriões.

Em embriões de peixes, estudos demonstram que a resistência ao frio tem uma relação direta ao desenvolvimento embrionário, ou seja, quanto mais desenvolvido, maior resistência dos embriões às baixas temperaturas (HAGEDORN et al., 2002; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008; SHAW; ORANRATNACHAI; TROUNSON, 2000; ZHANG; RAWSON, 1995). Segundo Isayeva, Zhang e Rawson (2004) folículos ovarianos apresentam maior

resistência aos ACPs e ao frio do que oócitos vitelogênicos em estágios de desenvolvimento mais avançado ou pós-ovulatórios. Gwo, Strawn e Arnold, (1995), Zhang e Rawson (1995) e Dinnyés et al., (1998), atribuem a redução e/ou inibição dos processos metabólicos e enzimáticos ao frio, efeitos estes que poderão prejudicar o processo de fertilização, como também, caso haja a fecundação, a embriogênese.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Os oócitos de peixes Neotropicais

Na maioria das espécies de peixes neotropicais os oócitos após liberados perdem a viabilidade em um período de tempo muito curto, podendo perder de mais de 50% do potencial de fertilização em uma hora de estocagem (RIZZO et al., 2003). Quando em contato com água, este tempo se reduz a alguns segundos, tal fato ocorre devido a reação cortical e exocitose do conteúdo dos alvéolos corticais, levando a um processo de fechamento da micrópila, impossibilitando a fertilização do gameta (HART, 1990; LINHART, 2001; OHTA et al., 1990). As causas da perda da viabilidade em oócitos de algumas espécies de peixes ainda são mal compreendidas. Alguns autores (e.g. KUDO, 1991; LINHART; OTOMAR et al., 1995; STOSS; DONALDSON, 1983), sugerem que a ativação cortical se inicia por reações bioquímicas provocadas por fatores como a penetração do espermatozoide no oócito, alterações de pH, variação pressão osmótica e modificação de íons específicos, principalmente Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg , sugerindo que tal processo possa ser espécie específico. Na truta por exemplo, os oócitos podem ser estocados por um certo período de tempo em fluido ovariano somente realizando a manutenção da temperatura de estocagem do material (GOETZ; COFFMAN, 2000).

Coffman e Goetz (1998) relatam a existência de um grupo de proteínas que são liberadas juntamente ao fluido ovariano durante a ovulação, que inibem alguns tipos de proteases presentes no fluido ovariano (e.g. collagenases, fosfatases, collagenases, gelatinases e lactato desidrogenase), permitindo assim a manutenção dos oócitos de forma similar aos alojados na

cavidade ovariana em estado não ativado. Juntamente com estas proteínas, outras substâncias e íons derivados do plasma sanguíneo, contribuem para o tamponamento do pH, e a estabilidade da pressão osmótica do fluido ovariano (COFFMAN; GOETZ, 1998; GOETZ; COFFMAN, 2000; RIME et al., 2004).

Em peixes neotropicais diferentemente dos salmonídeos, alguns fatores tornam inviável a estocagem dos oócitos por longos períodos de tempo. Um fato crucial é que devido à baixa produção de fluido ovariano, os gametas podem sofrer desidratação durante a estocagem ou sua manipulação mesmo em curtos períodos de tempo (RIZZO et al., 2003). Estudos de melhoramento biotecnológico na aquicultura como por exemplo programas de reprodução artificial, manipulação genética e crioconservação, frequentemente necessitam da manipulação dos oócitos, e muitas vezes essas técnicas se tornam limitadas ou inviáveis pela falta de informações acerca da utilização de soluções artificiais durante a manipulação e manutenção das características morfofisiológicas dos oócitos.

A tempos os criobiologistas utilizam soluções artificiais salinas como meio de diluir e estender a viabilidade do sêmen em diversas espécies de ciprinídeos (YANG et al., 2006; YAMASHIRO et al., 2007; HU et al., 2009) e peixes neotropicais (GODINHO; VIVEIROS, 2011), porém, muito pouco é relatado acerca da utilização dessas soluções em oócitos. Na tentativa de manter a capacidade de fertilização de oócitos por um tempo maior, utiliza-se algumas soluções salinas como Solução salina balanceada de Hank (GUAN; RAWSON; ZHANG, 2008c; ZHANG et al., 2005a), Solução de Ringer (GILKEY, 1983; STOSS, 1983; TOKUMOTO et al., 2011) e soluções salinas com a incorporação de proteínas (e.g. albumina bovina) (STOSS; DONALDSON, 1983; VALDEZ-JR. et al., 2005; GUAN et al., 2008a; YASUI et al., 2010).

2.2 Congelamento de oócitos de peixes

Protocolos que abordam a criopreservação de sêmen em peixes neotropicais está atualmente bem documentado (GODINHO; VIVEIROS, 2011; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008). Entretanto quando refere à criopreservação de oócitos de teleósteos neotropicais, a situação é mais delicada, não é

relatado na literatura algum tipo de protocolo efetivo para o congelamento e descongelamento deste tipo de material biológico (STREIT-JR et al., 2014).

Inúmeras variáveis dificultam o processo de congelamento de oócitos, um dos fatores mais relevantes durante a criopreservação de oócitos em peixes, é baixa permeabilidade das membranas (o córion e membranas associadas ao oolema), principalmente a membrana mais externa, o córion, não permitindo uma incorporação adequada dos agentes crioprotetores (ACPs), e conseqüentemente não fornecendo a proteção necessária para evitar a formação de cristais de gelo internamente, gerando criolesões nos oócitos (DINNYÉS et al., 1998; ZHANG; RAWSON, 1995).

Dificuldades em obter uma concentração efetiva das soluções crioprotetoras (SCPs) que impeça a formação de cristais de gelo, sem que a mesma afete a viabilidade do material são informações primordiais (SUZUKI et al., 1994). Uma vez que todas essas substâncias utilizadas como ACPs são tóxicas em algum momento, o uso inapropriado das mesmas podem acarretar diversas injúrias nas células (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008; ROBLES et al., 2004; STOSS; DONALDSON, 1983; ZHANG; RAWSON, 2007).

Agentes crioprotetores (ACPs) são substâncias que permitem a redução do ponto crioscópico das soluções crioprotetoras (SCPs) utilizadas durante o processo de criopreservação em temperaturas inferiores a zero grau (célsius) evitando a formação de cristais de gelo, sendo que, cada solução possui um ponto crioscópico distinto (CABRITA et al., 2003). Os laboratórios que produzem tais produtos frequentemente utilizados como ACPs relatam que a redução do ponto crioscópico da solução, faz com que apesar da baixa temperatura (geralmente abaixo do ponto crioscópico da água), a mesma permanece em estado líquido, sem mudança de sua massa, reduzindo assim os problemas acerca da faixa de temperatura em que ocorre a nucleação do gelo, geralmente entre 0° e -40° célsius (SIGMA-ALDRICH, 2012).

De acordo com as características moleculares das substâncias crioprotetoras, estas podem ser divididas em dois grupos (CASTRO et al., 2011), são elas: os crioprotetores que apresentam baixo peso molecular e difundem através das membranas celulares, conhecidos como crioprotetores internos ou intracelulares, como exemplo, o Metanol, Dimetilsulfoxido,

Etilenoglicol, Dimetilformamida, Propilenoglicol (CASTRO et al., 2011). E os reagentes que possuem moléculas maiores e por sua vez não penetram através das membranas celulares devido ao alto peso molecular, são chamados de crioprotetores externos ou extracelulares como sacarose, agarose, álcool polivinílico, trealose e outros sacarídeos (PAULA et al., 2014; STREIT-JR et al., 2014).

Assim, para o congelamento de oócitos, faz-se necessário o uso de substâncias (ACPs) que protejam as membranas celulares (HARVEY; ASHWOOD-SMITH, 1982), proporcionando a desidratação das células e a incorporação destes, sem que estas gerem danos à célula (ROBLES et al., 2004). A relação entre a concentração das substâncias necessárias para um congelamento efetivo sem a formação de cristais de gelo, bem como a toxicidade destes produtos, são conhecimentos chaves para o sucesso da técnica (SUZUKI et al., 1994; ROBLES et al., 2004).

2.3 O Curimbatá (*Prochilodus lineatus*)

Prochilodus lineatus (Valenciennes, 1837), é um Caracídeo da família Prochilodontidae. Comumente conhecido como Curimbatá ou Curimba, podem atingir quando adultos mais de 9,0 kg e 80 cm de comprimento. Esta espécie possui ampla distribuição biogeográfica, tendo registro nas drenagens dos rios Paraná, Paraguai e Paraíba do Sul (CASTRO, 1990). A espécie possui uma coloração cinza esverdeada no dorso, flancos com linhas longitudinais escuras entre as séries de escamas, e um ventre prateado. Sendo animais reofílicos, tem preferência por ambientes lóticos, sendo frequentemente observado na superfície da água, em áreas de remanso na calha dos grandes rios (VAZZOLER, 1996; DIAS; SHIBATTA, 2006).

Esta espécie prefere as cabeceiras dos rios como sítio de desova, os ovos e larvas são levados e dispersos pelo fluxo de água a jusante do local da reprodução, chegando até as lagoas marginais onde realizam seu desenvolvimento inicial. Posteriormente com a chegada das chuvas na época das cheias, a calha dos rios extravasa suas delimitações normais e se ligam a

estas lagoas, possibilitando aos alevinos acesso ao ambiente lótico (VAZZOLER, 1996; RIZZO et al., 2003; DIAS; SHIBATTA, 2006).

Prochilodus lineatus é uma espécie de grande importância ecológica, sendo considerada uma espécie chave dentro de grandes cadeias tróficas (ANTONIO et al., 2007). A espécie também é uma das mais importantes para a pesca comercial no alto Paraná, isso por sua vez juntamente com as mudanças causadas pela ação antrópica em seu habitat, como o barramento dos rios, redução da vegetação ciliar, dentre outras, reflete no declínio das populações naturais da espécie, e conseqüentemente gera perturbações no ecossistema a qual a espécie está inserida (DIAS; SHIBATTA, 2006; ANTONIO et al., 2007).

Devido a sua boa resposta alimentar em cativeiro e reproduzir-se com relativa facilidade após a indução hormonal, *P. lineatus* é referência como modelo biológico em estudos de fisiologia (CARVALHO; FERNANDES, 2008), toxicidade (CAVALCANTE et al., 2010), criopreservação de genoma (CAROLSFELD et al., 2003; COSER; GODINHO; RIBEIRO, 1984; FELIZARDO et al., 2010; MILIORINI et al., 2011; NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; DE AZEVEDO, 2006; PAULA et al., 2014; VIVEIROS et al., 2009, 2010; VIVEIROS et al., 2011) e ecologia (FENERICH-VERANI et al., 1984; SMOLDERS et al., 2002; CAPELETI; PETRERE, 2006) em peixes neotropicais. Do ponto de vista sócio/econômico a espécie desempenha papel importante na pesca comercial e durante a produção de larvas para a alimentação de peixes carnívoros na piscicultura comercial e em programas de repovoamento de estoques naturais (BARRERO et al., 2008).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo é desenvolver um protocolo efetivo para o congelamento de oócitos de Curimba (*Prochilodus lineatus*).

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a solução salina mais adequada à manutenção das características morfofisiológicas dos oócitos de *P. lineatus* durante sua manipulação;
- Investigar a toxicidade das substâncias crioprotetoras;
- Avaliar a sensibilidade dos oócitos expostos as baixas temperaturas;
- Criopreservar os ovócitos de *P. lineatus*, mantendo sua viabilidade pós descongelamento;
- Investigar os danos morfológicos gerados pelos tratamentos sobre os oócitos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Manutenção dos animais e obtenção dos oócitos

Foram utilizados oócitos de *P. lineatus* obtidos por reprodução artificial, oriundas de matrizes do plantel de reprodutores existente no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais - CEPTA/ICMBIO, Pirassununga, São Paulo e Estação Ambiental de Volta Grande, Conceição das Alagoas, Minas gerais. Os animais foram mantidos em tanques escavados e alimentados com ração comercial (com 28 a 32% proteína bruta). As matrizes foram induzidas à desova por meio de injeções intra-celomáticas contendo GnRHa + antidopaminérgico (Ovopel®, D-Ala6, Pro9NEt-mGnRH + metoclopramida; Interfish Ltd. Hungary), em duas doses para as fêmeas (0,5 mg e 5mg. Kg⁻¹ de peixe vivo) com intervalo de dez horas entre as aplicações. Nos machos foi administrada uma dose (5mg Kg⁻¹) aplicada de forma a coincidir com a segunda dose das fêmeas. A extrusão dos oócitos e do sêmen foi realizada por meio de massagem abdominal no sentido antero-posterior. O sêmen foi armazenado em tubos plásticos tampados de 15 ml, e a desova armazenada em potes plásticos estéreis com tampa durante a distribuição das alíquotas dos tratamentos.

Os procedimentos metodológicos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Engenharia, UNESP / Ilha Solteira, São Paulo, Brasil.

4.2 Escolha das soluções salinas

Foram avaliadas cinco soluções salinas: Solução de Ringer (116 mM de NaCl, 2,9 mM de KCl, 1,8 mM de CaCl₂ em tampão HEPES, pH 7,2) (WUSTEMAN et al., 2008; YASUI et al., 2010), Solução de Ringer lactato (102 mM de NaCl, 4 mM de KCl, 1,5 mM de CaCl₂ e 28 mM C₃H₅O₃Na, pH 7,0), Solução Salina

Balanceada de Hank (HBSS) (0,137 mM de NaCl, 5,4 mM de KCl, 0,25 mM de Na_2HPO_4 , 0,44 mM de KH_2PO_4 , 1,3 mM de CaCl_2 , 1 mM de MgSO_4 e 4,2 mM de NaHCO_3 , pH 8,0) (GUAN et al., 2008a; YASUI et al., 2010), HBSS sem cálcio (0,137 mM de NaCl, 5,4 mM de KCl, 0,25 mM de Na_2HPO_4 , 0,44 mM de KH_2PO_4 , 1 mM de MgSO_4 e 4,2 mM de NaHCO_3 , pH 8,0) e Solução para ovos de salmonídeos (0,145 mM de NaCl, 3,4 mM de KCl, 3 mM de CaCl_2 , 0,5 mM de MgSO_4 , BSA 1 g/L e ácido cítrico até pH 8,4) (STOSS; DONALDSON, 1983).

Para tal, foram separadas amostras com 500 oócitos em tubos plásticos graduados de 50 mL, imersas em 10 mL de solução salina e mantidas nestas por duas horas, à 22°C, perfazendo cinco repetições (uma fêmea por repetição). Após o período de exposição os gametas foram avaliados quanto à hidratação, ativação cortical e fertilidade. Para a análise de fertilidade, 50 oócitos de cada tratamento foram fertilizados com 100 microlitros de sêmen fresco, previamente avaliado quanto à sua qualidade (foram utilizados sêmen com motilidade >80% avaliados de forma subjetiva em microscópio óptico), incubados até o estágio de neurula, posteriormente os mesmos foram fixados para análises. Como controle, foram utilizados dois grupos com 50 oócitos cada: C1 – os oócitos foram fertilizados logo após a extrusão, visando averiguar a qualidade dos oócitos; C2 – os oócitos foram estocados sem a influência da solução salina, somente com o fluido ovariano, pelo mesmo período de tempo dos tratamentos, visando avaliar a influência do tempo de estocagem.

4.3 Toxicidade dos agentes crioprotetores

Foram avaliadas a toxicidade de três ACPs diferentes, o Metanol (MET), Dimetilsulfoxido (DMSO), e Propilenoglicol (PG), visando abordar: (1) a elaboração de protocolos de congelamento lento (baixas molaridades com maior tempo de exposição), e (2) protocolos para vitrificação, sendo necessárias altas molaridades e redução do tempo de exposição aos ACPs. A escolha dos ACPs foi realizada com base na literatura (GUAN et al., 2008a; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008).

Para este trabalho oócitos de 6 fêmeas foram utilizados, sendo 3 para cada experimento. Para cada tratamento, amostras com cerca de 221 ± 14 oócitos foram colocadas em Solução Salina Balanceada de Hank (HBSS) logo após serem coletados das fêmeas (a escolha da solução foi realizada com base nos resultados do presente estudo). Posteriormente os oócitos foram expostos a dois tratamentos diferentes:

Tratamento 1: Exposição de 20 minutos em três soluções crioprotetores contendo: HBSS + ACP (DMSO, PG ou MET). Foi avaliado quatro molaridades diferentes 0,5M, 1M, 2M e 4M de cada ACP. Durante a exposição aos ACPs optou-se com base no trabalho de Guan, Rawson e Zhang (2008b), a exposição de forma gradual com osmolaridade crescente, afim de evitar choque osmótico, como exemplificado na Figura 1. Posteriormente os oócitos foram lavados em HBSS e fertilizados com 20 μ l de sêmen de três machos (um para cada fêmea perfazendo um casal por repetição) previamente avaliados quanto sua motilidade (foram utilizados sêmen com motilidade >80% avaliados de forma subjetiva em microscópico óptico) e incubados até o estágio de neurula. Após este processo as amostras foram fixadas para contagem.

Tratamento 2: Os oócitos foram expostos a DMSO e PG em três molaridades diferentes, 6M, 8M e 10M. Foram avaliados três tempos de exposição, 2,5 min., 5 min. e 7,5 min. Após este período os oócitos foram lavados em HBSS, fertilizados e incubados até o estágio de neurula, posteriormente amostras foram fixadas para contagem.

4.4 Sensibilidade ao frio

Para a avaliação da sensibilidade ao frio, amostras com cerca de 169 ± 40 oócitos (pertencentes a mesma desova utilizada no **Tratamento 2**) foram expostos ao frio em temperatura de $2,5 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ durante 30 min., 60 min., 90 min. e 120 min., por sequência fertilizados com 20 μ l de sêmen. Após este processo os oócitos foram incubados até o estágio de neurula e fixados para análises. Como controle amostras foram mantidas em temperatura ambiente ($25,3^{\circ}\text{C}$) em tubos plásticos fechados, sendo estes fertilizados nos mesmos

tempos dos tratamentos. A temperatura durante o experimento foi monitorada com data loggers (HOBO - UA002-64) com precisão de 0,01°C e marcações a cada um minuto.

4.5 Procedimentos de congelamento e descongelamento

Após o protocolo de incorporação de ACPs do “**Tratamento 1**” citado acima, os oócitos foram envasados em paletas estéreis de 0,25 ml em SCP contendo 4 M de ACP + HBSS + 0,2 M de glicose. Posteriormente os oócitos foram expostos a uma curva de congelamento lento (de 25°C a 0°C, 60°/min.>> 0°C a -10°C, 7,7°/min.>> -10°C a -40°C, 14,5°/min.>> -40°C a -80°C, 30,7°/min.>> -80°C a -185°C, 10,4°/min.) em vapor de nitrogênio em botijão do “tipo seco” de 8 litros (Dry Steam Shippers), por fim as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido, permanecendo estocadas por no mínimo de 24 horas antes de serem descongeladas. Para o descongelamento, as palhetas foram mergulhadas em um “banho-maria” de HBSS a 70°C, por 10 segundos. Os oócitos descongelados foram imediatamente avaliados quanto a capacidade de hidratação, e amostras foram fixadas para procedimentos histológicos.

4.6 Avaliação morfofisiológica

A hidratação oocitária foi avaliada por meio de observação direta da variação do espaço perivitelino sob estereomicroscópio (Motic SMZ-168) e a reação cortical e morfologia dos oócitos foram avaliadas por meio de análise histológica. Para preparação histológica, amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2% em tampão fosfato Sorensen 0,1 M pH 7,2 (Karnovsky), posteriormente desidratadas em série alcoólica e incluídas em metacrilato glicol (Historesina Leica). O material foi submetido a cortes de 3μ de espessura em micrótomo (LEICA RM 2245) equipado com navalha de vidro. Os cortes foram corados em azul de toluidina pH 7.0 e hematoxilina de Harris-eosina e fotomicrografados sob microscópio óptico (Zeiss Axio Scope A1 e AxioCam MRc5).

4.7 Estatística e análise dos dados

Os dados obtidos foram avaliados quanto à normalidade por teste de Shapiro Wilk e homocedasticidade por meio do teste de Barlett. Quando os resultados apresentaram os requisitos necessários *a priori* das análises estatísticas, a comparação dos resultados foi realizada por meio do teste de Kruskal-Walis. Durante a comparação das taxas de fertilidade, os tratamentos foram avaliados em relação à média da taxa de fertilidade do grupo controle. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software R, os resultados são expressos por meio de média e desvio padrão.

5. RESULTADOS

5.1 Hidratação, ativação cortical e morfologia dos oócitos

Das cinco soluções salinas empregadas neste estudo, somente a HBSS, e HBSS sem cálcio não hidrataram os oócitos após o período de duas horas de exposição (Figs. 2d-c). Histologicamente observou-se nos oócitos do grupo controle (C2) uma forma irregular, não esférica, com numerosos alvéolos corticais periféricos de forma elíptica circundando todo o ooplasma cortical, leve retração do oolema em relação ao córion em algumas regiões, glóbulos de vitelo acidófilos e ooplasma basófilo, mais evidente na região alveolar (Figs. 2a-b-c). Os oócitos submetidos a solução de HBSS e HBSS sem cálcio apresentaram forma esférica, com alvéolos corticais seguindo a mesma disposição e quantidade do controle, porém estes com forma esférica e não elíptica, glóbulos de vitelo acidófilos, ooplasma basófilo, semelhante ao controle e oolema sem áreas de retração, totalmente em contato com o córion (Figs. 2e-f-h-i).

Nos demais tratamentos, Solução de Ringer, Ringer Lactato e na Solução para ovos, os oócitos apresentavam um espaço perivitelino bem delimitado, redução dos alvéolos corticais a presença de vesículas corticais rompidas (Figs. 3c-e-f-h-i). Os glóbulos de vitelo seguiram o mesmo padrão do controle em todos os tratamentos, com aparência arredondada, acidófilos e em grande quantidade, ooplasma basófilo e menos delimitado. Nas amostras submetidas a Solução de Ringer e Ringer lactato, observou-se algumas áreas basófilas na região entre o oolema e o espaço perivitelino (Figs. 3b-c-e).

5.2 Teste de Fertilização

A taxa de fertilização média logo após a extrusão (C1) foi de $65,0 \pm 26,8\%$ e após duas horas de estocagem somente em fluido ovariano sem a utilização de soluções salinas (C2), foi de $28,8 \pm 40,9\%$. Os valores médios de fertilização dos oócitos submetidos a estocagem nas soluções de HBSS e HBSS sem

cálcio foram $16,3\pm 39,5\%$ e $5,6\pm 7,3\%$, respectivamente (Fig. 4). Não houve diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos e C2, mas estes proporcionaram valores menores e significativamente diferentes de C1 (Fig. 4).

5.3 Sensibilidade aos agentes crioprotetores

Os dados obtidos não atenderam às premissas básicas para comparação dos valores médios por meio de análises estatísticas. Entretanto, por meio dos valores observa-se uma alta sensibilidade dos oócitos aos ACPs do tratamento 1 (Fig. 5). Referente ao PG a em 1 Molar caiu de $41\pm 61\%$ para $0,9\pm 0,8\%$ em 2M (Fig. 5). Para o DMSO, após 20 minutos de exposição os valores de fertilização caíram de $54,6\pm 51,6\%$ em 0.5M para $2,3\pm 2,6\%$ em 1M (Fig. 5). Não foi registrado viabilidade nos oócitos expostos ao MET.

Observou-se que apesar dos maiores valores obtidos após a exposição a 1 molar de PG e 0,5 molar de DMSO os dados foram mais variáveis (observado pela grande variação do desvio padrão) com observado na Fig. 5, e que na molaridade de 0,5 M de PG foi o ACP que apresentou a menor variabilidade. No tratamento 2 todas as amostras submetidas as altas molaridades dos ACPs não apresentaram fertilização.

Morfologicamente observou-se no tratamento 1 uma leve desidratação dos oócitos submetidos aos três ACPs na concentração de 4 M após 20 minutos de exposição (Fig.6). Foram observadas injúrias na região mediana do córion após a exposição aos ACPs no mesmo experimento (Fig. 6). No tratamento 2 observou-se uma intensa desidratação dos oócitos em ambos os ACPs avaliados (Figs. 7 e 8). As molaridades de 8 M e 10 M de DMSO e 10 M de PG foram as concentrações que apresentaram as maiores alterações morfológicas, como a intensa deformação da configuração esférica do oócitos, e a desconexão entre o oolema e o córion. Apesar das alterações morfológicas não foi observado o rompimento dos alvéolos corticais e dos glóbulos de vitelo (Figs. 9 e 10).

5.4 Sensibilidade a baixa temperatura

Observou-se uma alta sensibilidade dos oócitos ao frio. Após 30 minutos foi observado uma significativa queda na capacidade de fertilização variando de $69,7 \pm 6,2\%$ em temperatura ambiente (grupo controle) para $4,7 \pm 0,0\%$ (Fig. 11) quando expostos a baixa temperatura. Devido a variação dos resultados correspondentes as taxas de fertilização, não foi possível observar uma tendência na queda da viabilidade dos oócitos. Nos tratamentos de 60 e 120 min. expostos ao frio não foi observado fertilização (Fig. 11), porém os oócitos estocados pelo mesmo período em temperatura ambiente apresentaram $10,4 \pm 9,3\%$ e $4,0 \pm 0,0\%$ respectivamente (Fig. 11).

Foi possível observar uma influência do tempo de estocagem na redução da viabilidade dos oócitos. Apesar da diferença significativa entre a capacidade de fertilização observada entre o controle e após 30 minutos de estocagem, os valores apresentam certa similaridade quando considerado o desvio padrão das réplicas. Ainda referente ao tempo de estocagem, após 60 minutos em temperatura ambiente a capacidade de fertilização nos tratamentos declinou de forma significativa variando de $69,7 \pm 6,2\%$ em 30 minutos a $4,0 \pm 0,0\%$ em 120 minutos (Fig. 11).

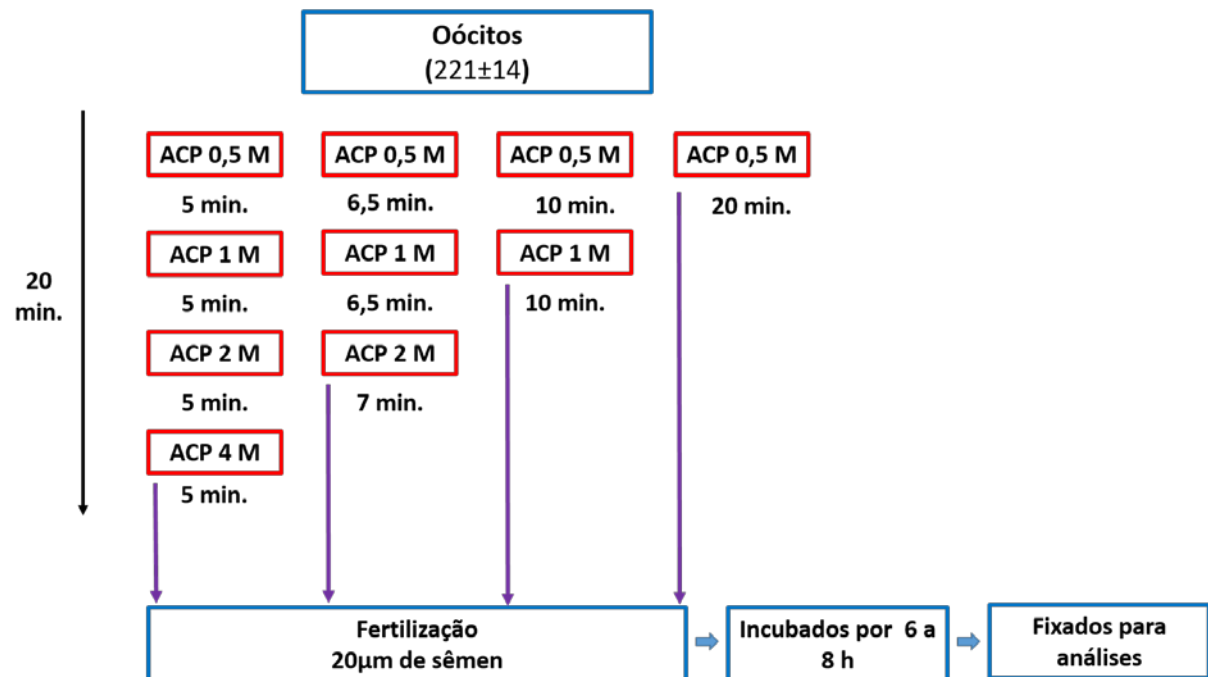
5.5 Injúrias geradas pelo congelamento

Os oócitos apresentaram algumas poucas e discretas injurias causadas pelo congelamento. Criolesões foram observadas em todos os tratamentos do tratamento 1 (Figs. 12b-d-f). Não se observou anormalidades nos glóbulos de vitelo ou alvéolos corticais, bem como nas demais estruturas dos oócitos, como as membranas do oolema ou arquétipo geral dos oócitos (Figs. 12a-c-e).

Mesmo sendo registrado algumas criolesões no córion dos oócitos, os mesmos não perderam a capacidade de hidratação. Os oócitos submetidos aos ACPs PG e MET apresentaram o processo de hidratação normal, similar a oócitos sem qualquer tipo de tratamento (Fig. 13). Entretanto apesar de apresentarem uma hidratação similar aos demais, os oócitos expostos ao

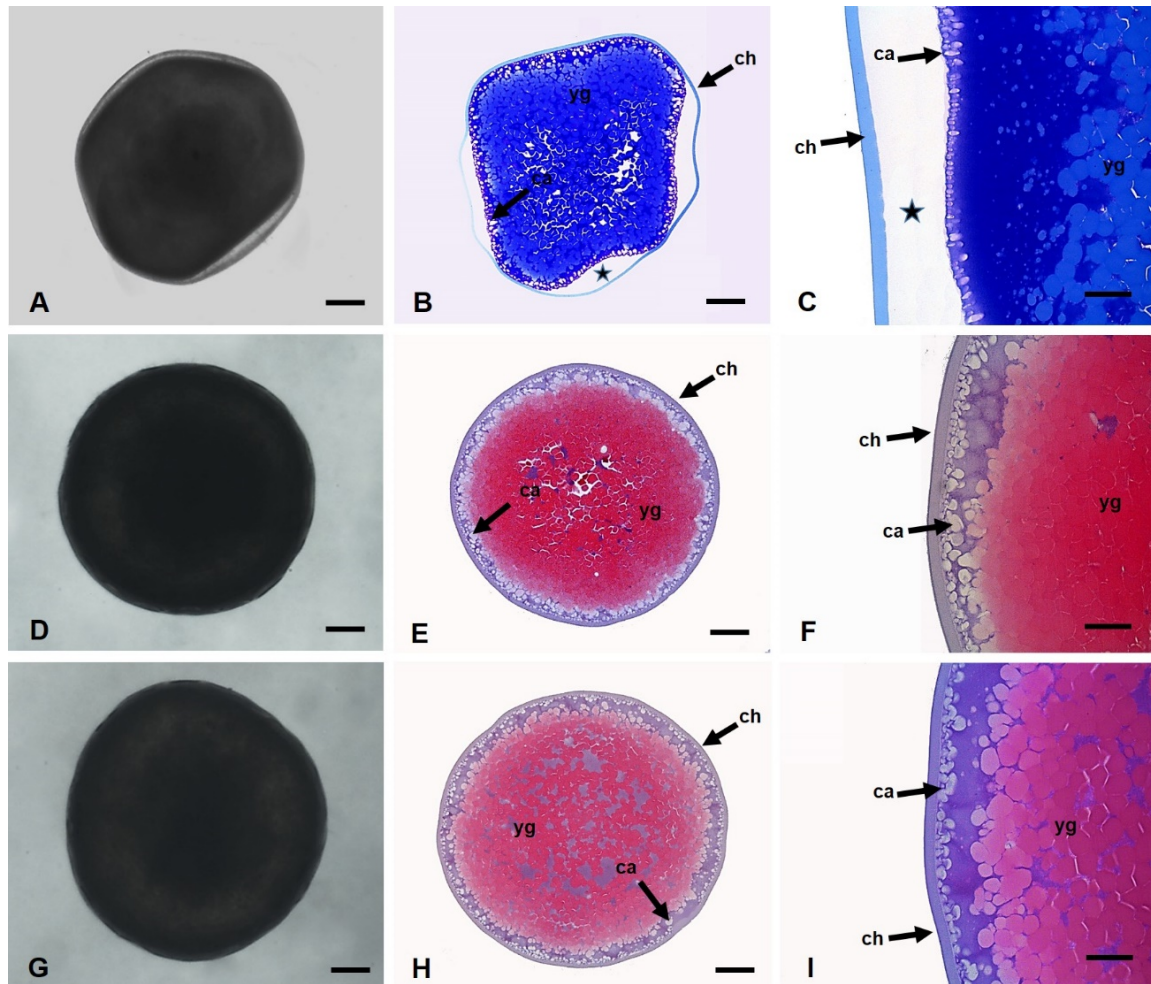
DMSO apresentaram uma significativa cor opaca (no oolema) após os primeiros quinze minutos no processo de hidratação (Fig. 13).

Figura 1. Esquema do delineamento do tratamento 1. Oócitos de *Prochilodus lineatus* com exposição de 20 minutos (tempo total) em exposição crescente em 0,5 M, 1 M, 2 M e 4 M de ACP.



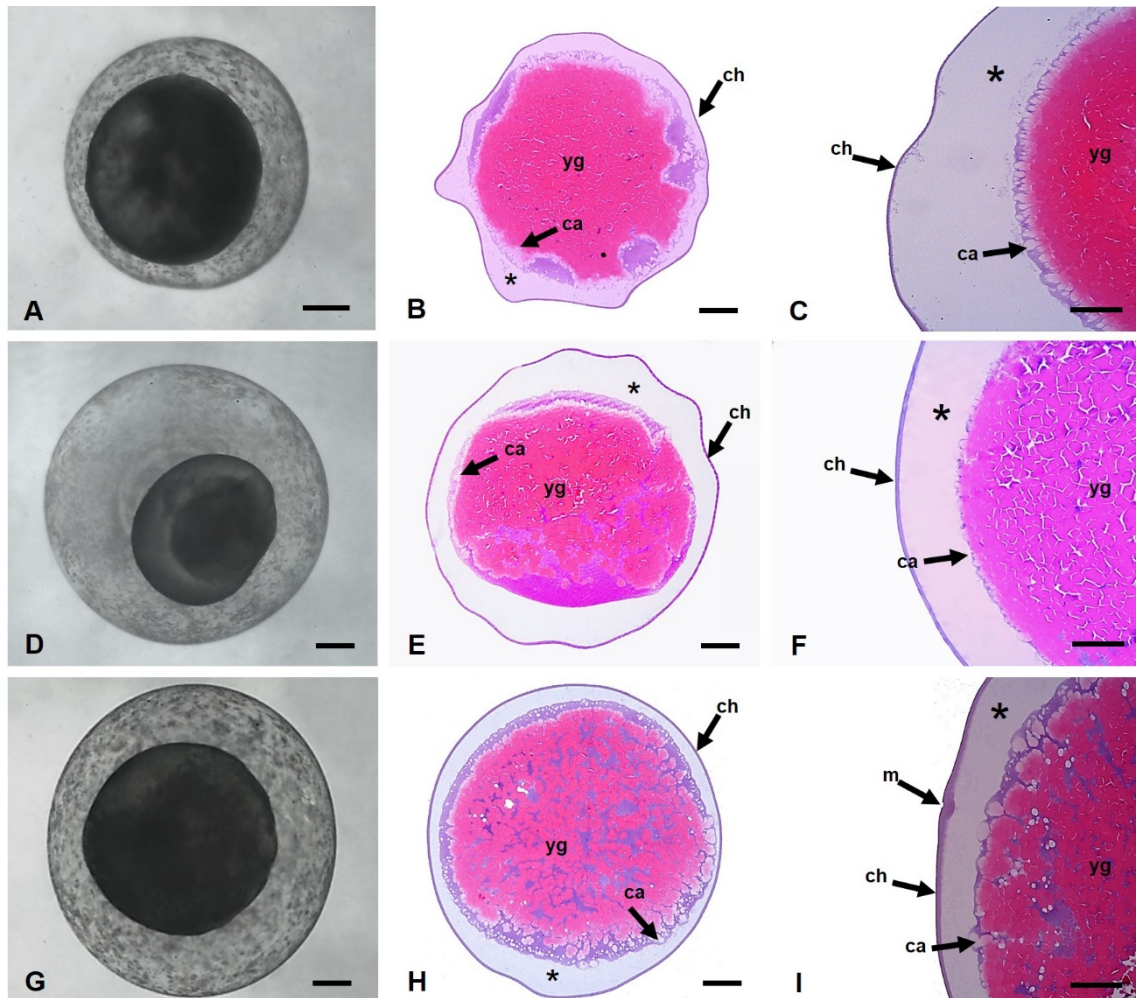
Fonte: próprio autor.

Figura 2. Oócitos de *Prochilodus lineatus* após exposição de duas horas às soluções salinas, (A, B e C) Controle 2, (D, E e F) HBSS sem cálcio e (G, H e I) HBSS. Legenda: (ch) córion, (ca) alvéolo cortical, (yg) glóbulos de vitelo, (estrela) área de retração do oolema. Barra de escala A, B, D, E, G e H = 200 μ m, C, F e I = 100 μ m).



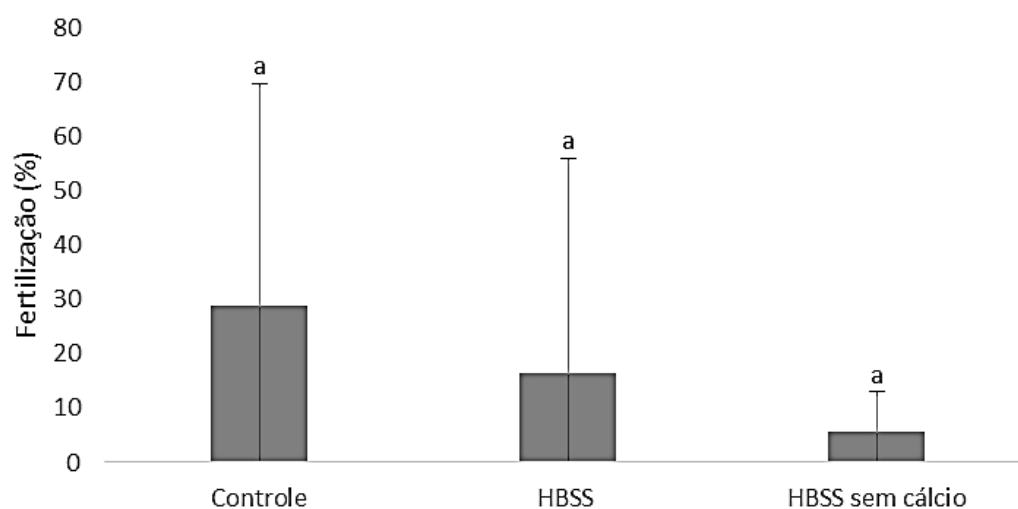
Fonte: próprio autor.

Figura 3 - Oócitos de *Prochilodus lineatus* após exposição de duas horas às soluções salinas, (A, B e C) Ringer, (D, E e F) Ringer lactato e (G, H e I) Solução para oócitos. Legenda: (ch) córion, (ca) alvéolo cortical, (yg) glóbulos de vitelo, (*) espaço perivitelino. Barra de escala A, B, D, E, G e H = 200 μ m, C, F e I = 100 μ m).



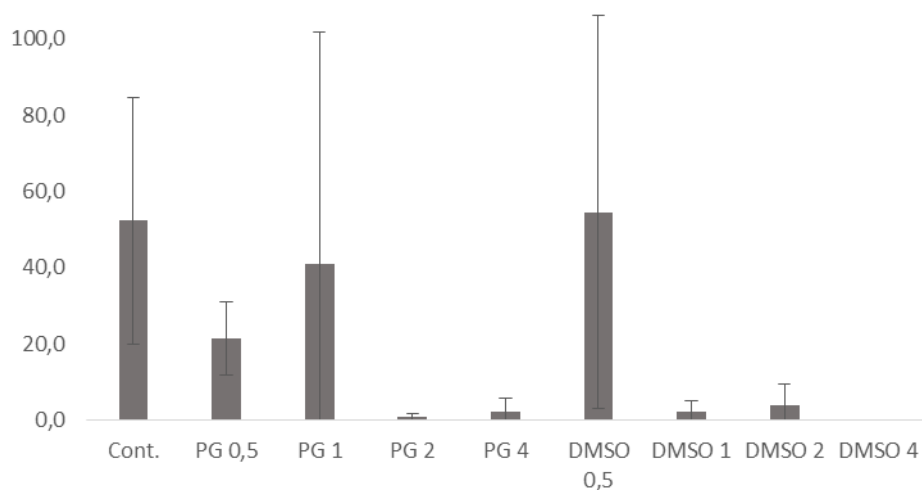
Fonte: próprio autor.

Figura 4. Taxa de fertilização dos oócitos de *Prochilodus lineatus*, do grupo controle (C2), e após 2 horas de exposição a HBSS, e HBSS sem cálcio. Letras iguais indicam que não houve diferenças estatísticas.



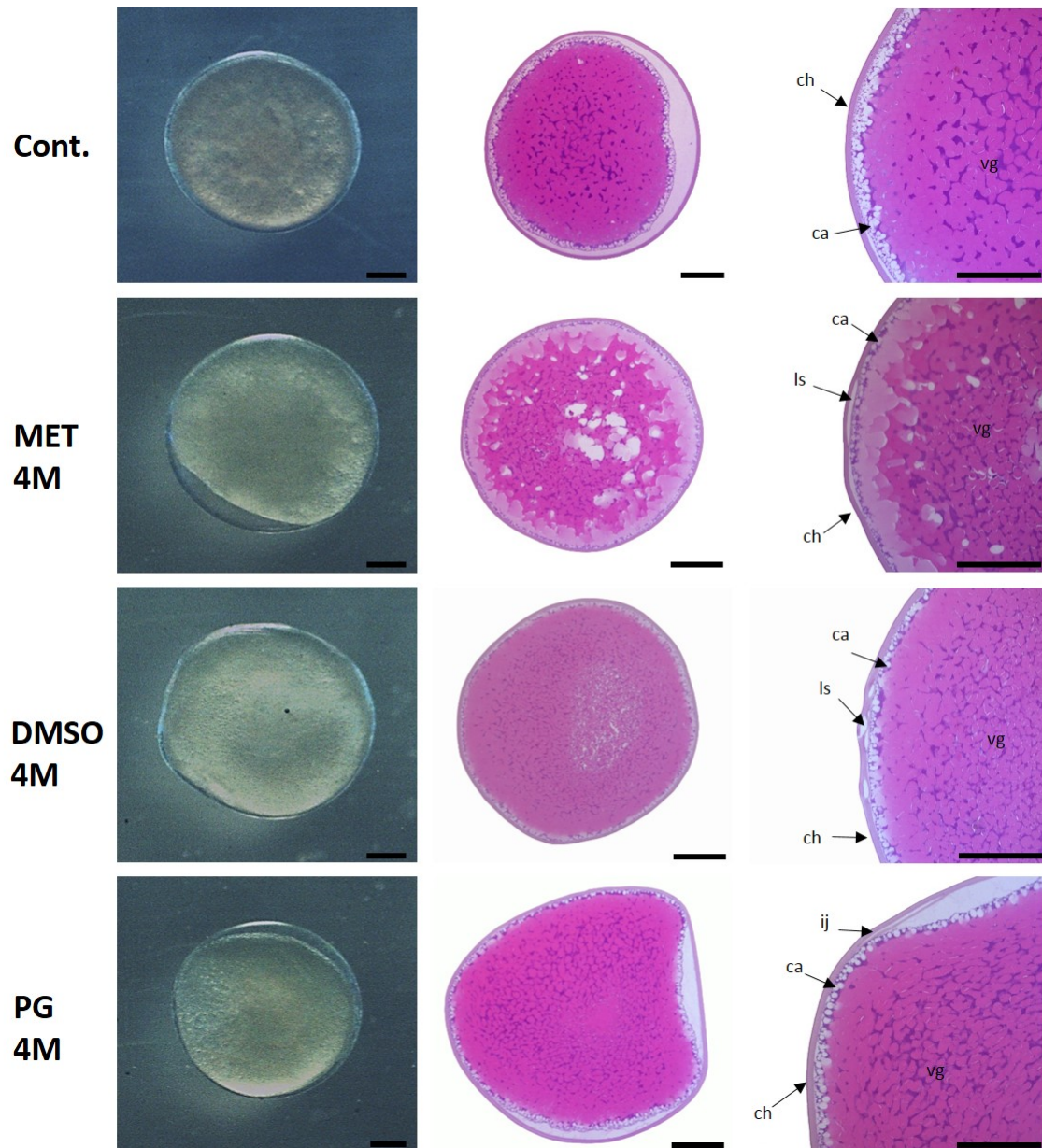
Fonte: próprio autor.

Figura 5. Taxa de fertilização dos oócitos de *Prochilodus lineatus*, do grupo controle, e após a exposição de 20 minutos a 0.5 M, 1 M, 2 M e 4 M de ACP. Legenda: (Cont.) controle, (PG) Propilenoglicol e (DMSO) Dimetilsulfoxido. Resultados expressos por média e desvio padrão. * Foram omitidos os dados do metanol devido à ausência de fertilização em todas as molaridades testadas.



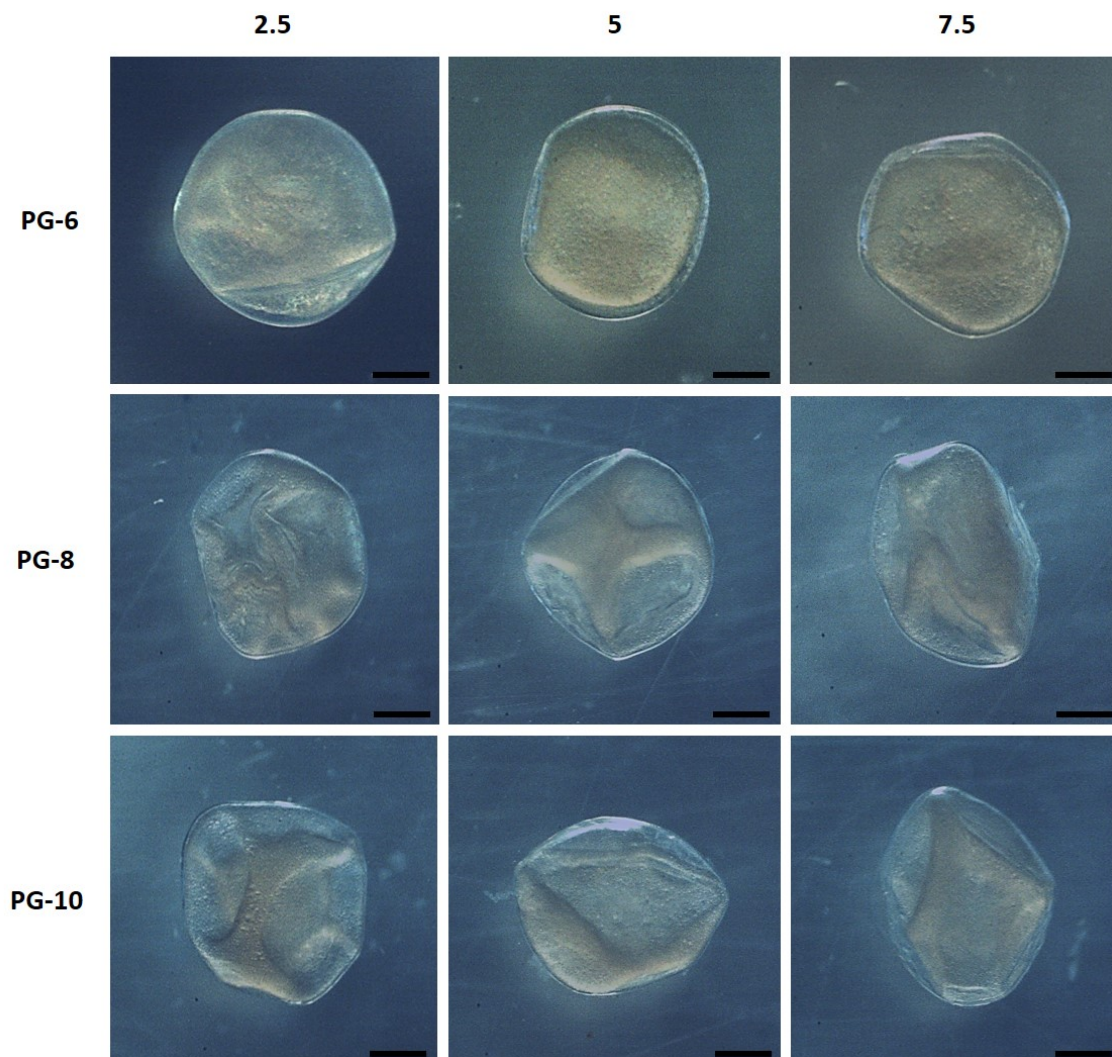
Fonte: próprio autor.

Figura 6. Fotomicrografias dos oócitos de *Prochilodus lineatus* 20 minutos de exposição a SCP contendo 4 M de ACP + 0,2 M de glicose e grupo controle. Coluna da esquerda em visão macroscópica do oócito. Coluna central e direita cortes histológicos indicando as injúrias. Legenda: (MET) Metanol, (DMSO) Dimetilsulfoxido, (PG) Propilenoglicol, (ij) crioinjúrias, (ch) córion, (ca) alvéolo cortical e (vg) glóbulos de vitelo. Barra de escala 250µm. Coloração: hematoxilina de Haris – eosina.



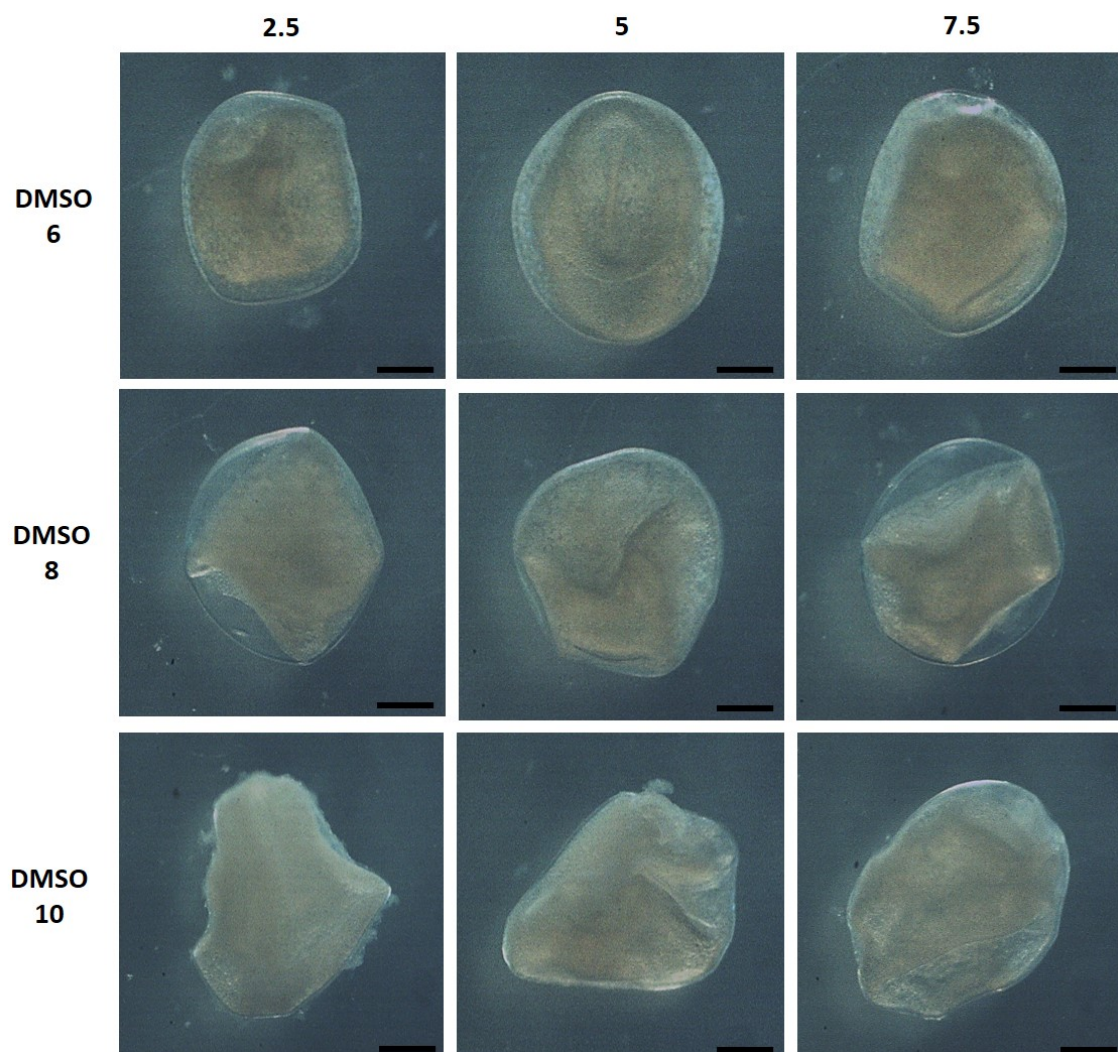
Fonte: próprio autor.

Figura 7. Morfologia dos oócitos de *Prochilodus lineatus* submetidos ao propileglicol (PG) a 6 M, 8 M e 10 M, em três tempos de exposição 2.5, 5 e 7.5 minutos. Barra de escala 250µm.



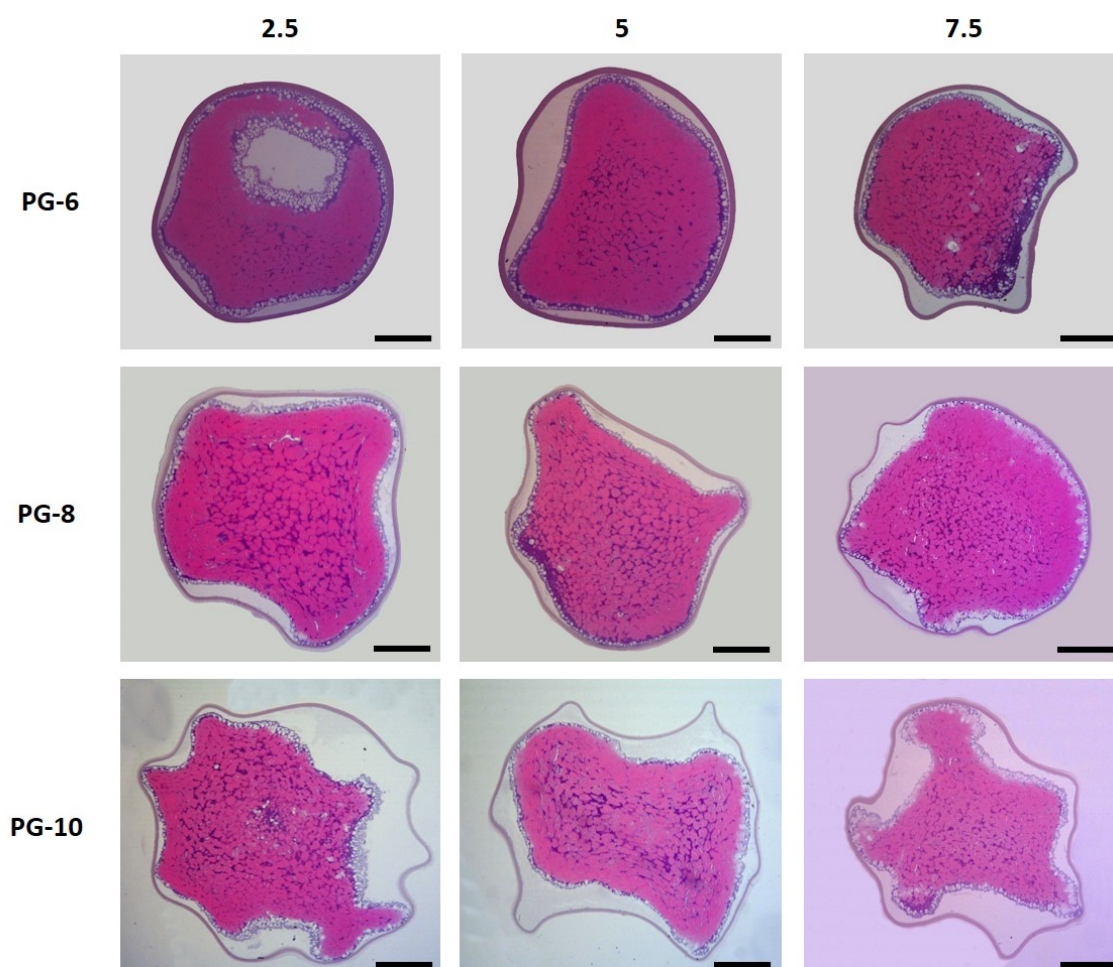
Fonte: próprio autor.

Figura 8. Morfologia dos oócitos de *Prochilodus lineatus* submetidos ao dimetilsulfoxido (DMSO) a 6 M, 8 M e 10 M, em três tempos de exposição 2.5, 5 e 7.5 minutos. Barra de escala 250µm.



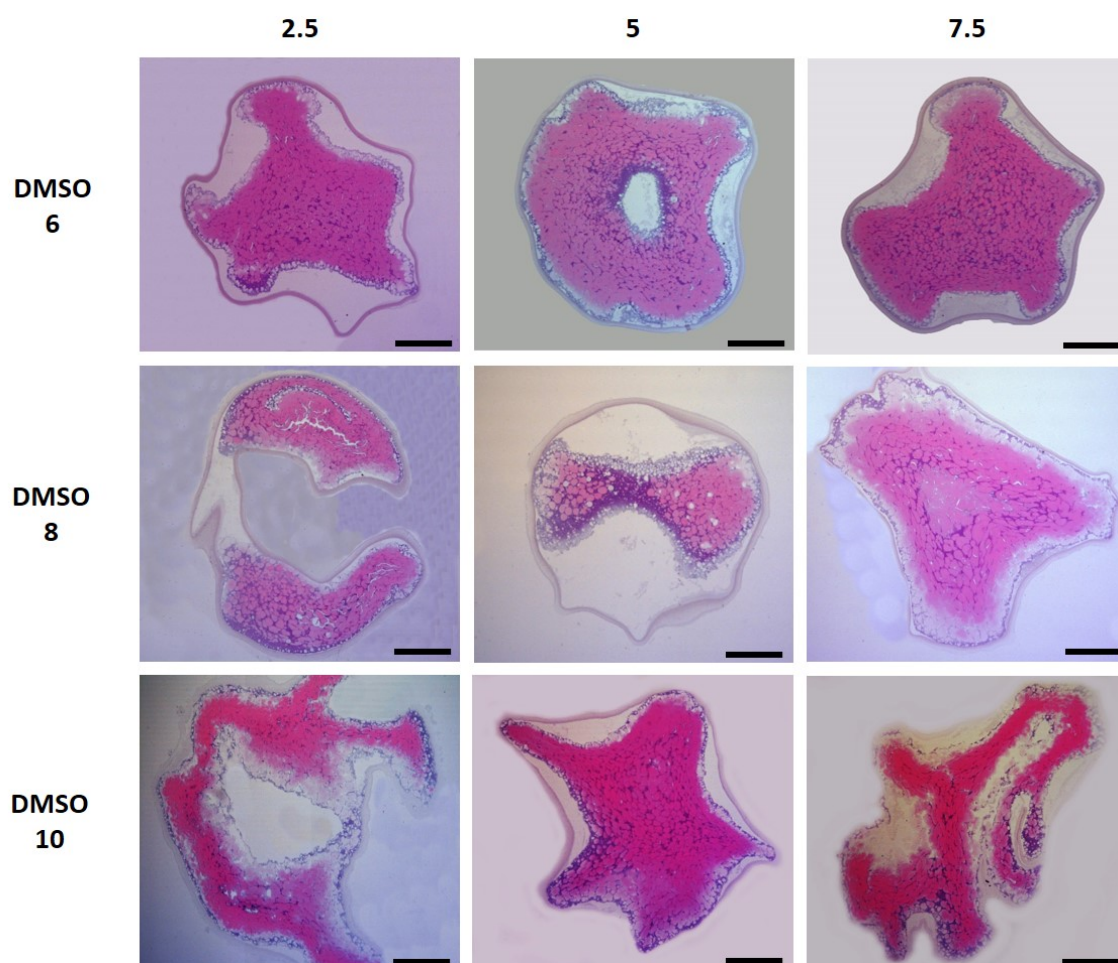
Fonte: próprio autor.

Figura 9. Fotomicrografia dos oócitos de *Prochilodus lineatus* submetidos ao propileglicol (PG) a 6 M, 8 M e 10 M, em três tempos de exposição 2.5, 5 e 7.5 minutos. Barra de escala 250µm. Coloração: hematoxilina de Haris – eosina.



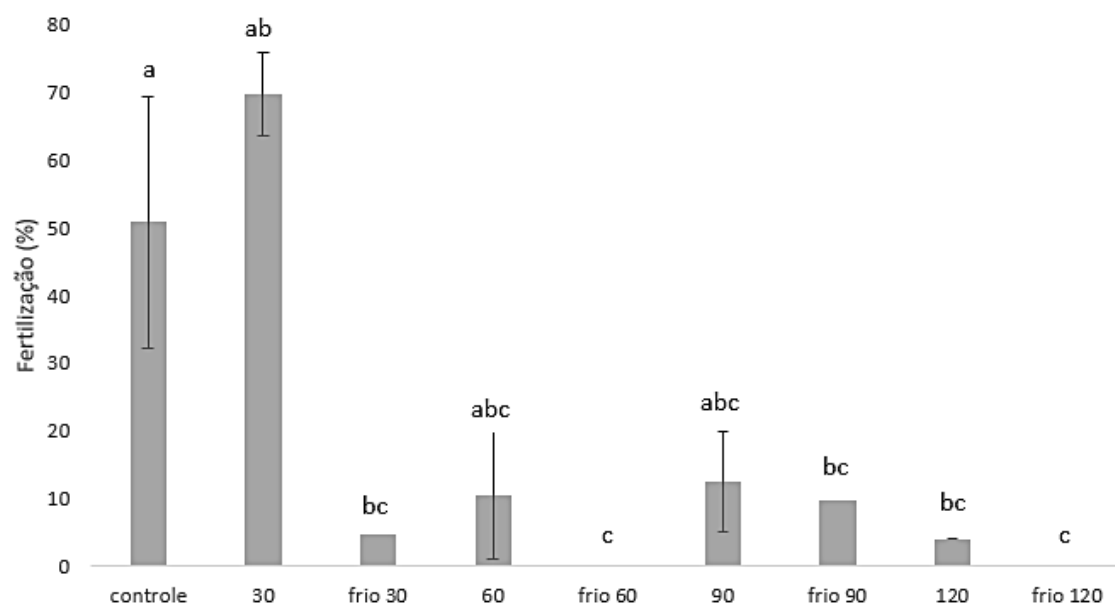
Fonte: próprio autor.

Figura 10. Fotomicrografia dos oócitos de *Prochilodus lineatus* submetidos ao dimetilsulfoxido (DMSO) a 6 M, 8 M e 10 M, em três tempos de exposição 2.5, 5 e 7.5 minutos. Barra de escala 250µm. Coloração: hematoxilina de Harris – eosina.



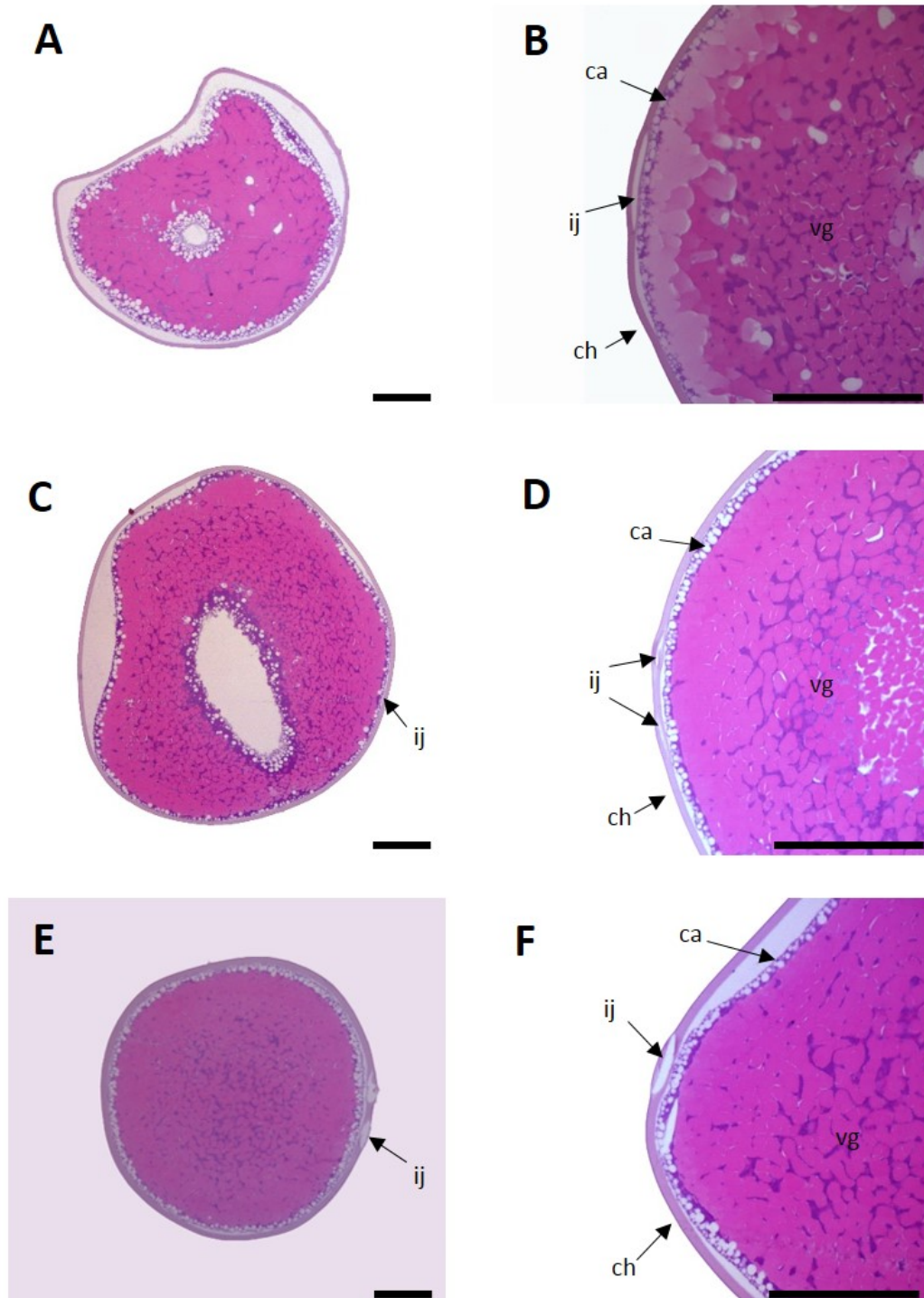
Fonte: próprio autor.

Figura 11. Taxa de fertilização dos oócitos de *Prochilodus lineatus*, do grupo controle, e após 30, 60, 90 e 120 minutos em temperatura ambiente (25,3°C) e submetidos a baixa temperatura (2,5°C±0,3°C). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significantes. Resultados expressos por média e desvio padrão.



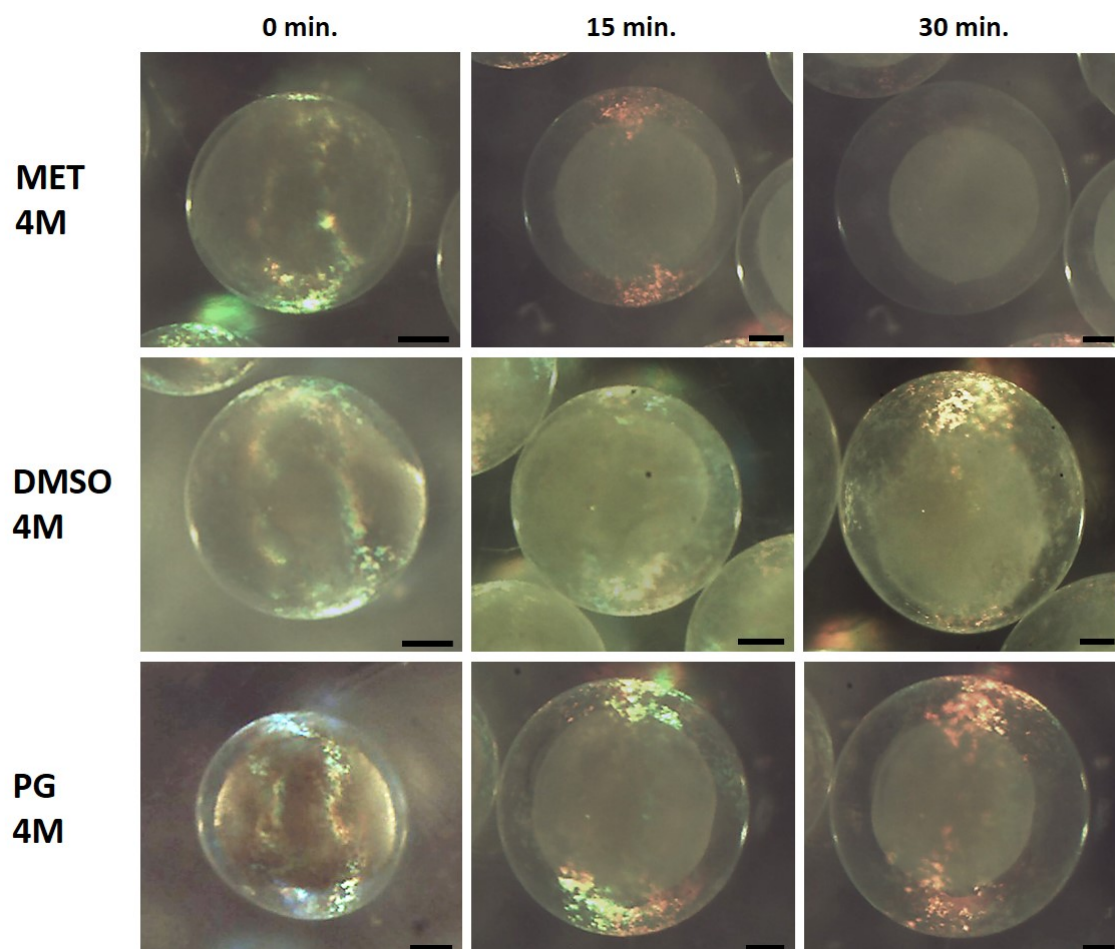
Fonte: próprio autor.

Figura 12. Fotomicrografias dos oócitos de *Prochilodus lineatus* após 20 minutos de exposição a SCP contendo 4 M de ACP + 0,2 M de glicose submetidos ao congelamento e descongelamento. Fotos (A e B) Metanol, (C e D) Dimetilsulfoxido e (E e F) Propilenoglicol. Legenda: (ij) crioinjúrias, (ch) córion, (ca) alvéolo cortical e (vg) glóbulos de vitelo. Barra de escala 250µm. Coloração: hematoxilina de Harris - eosina.



Fonte: próprio autor.

Figura 13. Hidratação dos oócitos de *Prochilodus lineatus* após 0, 15 e 30 minutos posteriormente ao congelamento e descongelamento em SCP contendo 4 M de ACP + 0,2 M de glicose. Legenda: (MET) Metanol, (DMSO) Dimetilsulfoxido, (PG) Propilenoglicol. Barra de escala 250µm.



Fonte: próprio autor.

7. DISCUSSÃO

Os oócitos de *P. lineatus* seguem o padrão da maioria dos peixes reofílicos migradores neotropicais, com gametas adaptados ao ambiente no qual a espécie está inserida (GODINHO; LAMAS; GODINHO, 2010), como a presença de grande quantidade de vitelo, e o aparecimento do espaço perivitelino após a ativação cortical (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006; GANECO et al., 2009). O aspecto geral dos oócitos pós ovulatórios de *P. lineatus* foi similar ao descrito por Freire-Brasil, 2001; Rizzo; Godinho; Sato, 2003.

A disposição dos alvéolos corticais estava de acordo com a proposta de Bazzoli e Godinho (1994) com diversas camadas descontínuas de pequenas vesículas no citoplasma cortical dispostos ao longo de toda a extensão do oolema.

Outra característica dos oócitos dos teleósteos reofílicos, são os processos que levam ao rápido fechamento da micrópila, reduzindo a capacidade de fertilização dos oócitos de alguns segundos a poucos minutos (RIZZO et al., 2003). Esta característica parece ser conservada em alguns grupos (VARI; MALABARBA, 1998), tratando-se de complexos eventos que envolvem vários mecanismos bioquímicos e biofísicos, como a despolarização de membranas, variações osmóticas com movimentação de íons específicos como Ca^{2+} , Mg e Na^{+} (MCMILLAN, 2007).

Observou-se uma redução significativa da viabilidade dos oócitos armazenados durante duas horas sem a presença da solução salina. Este fato é corroborado pelo trabalho de Rizzo e colaboradores (2003), em que relatam uma redução de mais de 50% na viabilidade dos oócitos de *P. marggravii*, um congênere de *P. lineatus* após duas horas de estocagem de seus oócitos, evento similar também relatado por Mollah; Tan (1983), Linhart et al., (1995) e Linhart (2001) para outras espécies.

Diferentemente dos peixes Neotropicais, oócitos de alguns Cypriniformes possuem auto ativação cortical quando liberados (LINHART, 2001; RIZZO; GODINHO; SATO, 2003), neste contexto a utilização de soluções artificiais é obrigatoriamente necessária, na intenção estender a

viabilidade dos oócitos durante sua manipulação. Em espécies que não existe auto ativação do oócito, algumas soluções salinas com diferentes formulações são utilizadas, como em *Oncorhynchus kisutch* e *Salmo gairdneri* (STOSS; DONALDSON, 1983), *Danio rerio* (GUAN; RAWSON; ZHANG, 2008a, c; TOKUMOTO et al., 2011; ZHANG et al., 2008), *Oncorhynchus keta* (HARVEY; ASHWOOD-SMITH, 1982), *Carassius sp.* (TOKUMOTO et al., 2004), *Oryzias latipes* (GILKEY; JOHN et al., 1978), porém nada é relatado para peixes neotropicais.

Ao contrário do observado por Stoss e Donaldson (1983), a Solução formulada para ovos de truta (*Oncorhynchus kisutch*) e salmão (*Salmo gairdneri*) não possibilitou a manutenção necessária às características fisiológicas dos oócitos de *P. lineatus*. O mesmo foi observado com a Solução de Ringer e Ringer com Lactato de sódio, em que ambas ativaram a reação cortical dos gametas. Apesar da Solução de Ringer com lactato de sódio não ser comumente utilizada, esta seria a solução salina com características osmóticas mais próximas do fluído ovariano de *P. lineatus*, pH 7,0 e 288mM (Fluído ovariano pH 7,5 e 289 mOsmol (n=5), avaliado em ensaios prévios).

A Solução de Ringer é utilizada com sucesso durante a manutenção das características oocitárias com algumas espécies como *Cyprinus sp.* e *Carassius sp.* (STOSS, 1983; TOKUMOTO et al., 2004), *Oryzias latipes* (GILKEY, 1983; GILKEY et al., 1978) e *Danio rerio* (TOKUMOTO et al., 2004), porém, a Solução de Ringer não foi capaz de fornecer condições adequadas para a não ativação dos oócitos de *P. lineatus*. A utilização da HBSS em sua formula completa ou modificada é empregada com frequência em trabalhos com oócitos, sêmen, células e tecidos com diferentes grupos animais (GUAN; RAWSON; ZHANG, 2008b; HAGEDORN; HSU; WILDT, 1997; YANG et al., 2006b; YASUI; FUJIMOTO; ARAI, 2010; ZHANG et al., 2008; ZHANG et al., 2005a). Os resultados do presente trabalho corroboram com a utilização da solução de HBSS com e sem a presença de cálcio como meio de manutenção de oócitos em estado não ativado, porém diferentemente ao observado em outros trabalhos (e.g. Sakai; Burgess; Hopkins, 1997) a HBSS com e sem cálcio não proporcionaram extensão da viabilidade dos oócitos, sugerindo a utilização destas soluções somente como meio artificial de manutenção em

curto prazo evitando, principalmente, a desidratação dos oócitos. Apesar de não haver diferença significativa entre a taxa de fertilização obtida entre as formulas da solução de HBSS com e sem cálcio, observa-se uma redução dos valores na taxa de fertilidade dos oócitos expostos em solução sem cálcio.

O cálcio tem papel importante durante o processo de fertilização do oócito, e parece ser fundamental para o desenvolvimento posterior do ovo (LEE et al., 1999). Em *Danio rerio* Runft et al. (2002) relatam um aumento das concentrações de cálcio alguns segundos após a entrada do espermatozoide no oócito. Ainda segundo os mesmos autores, o aumento dos níveis de cálcio é de origem endógena por meio de reservas intracelulares e coincidem com os eventos bioquímicos e biofísicos da ativação cortical e elevação do córion por meio da exocitose do conteúdo dos alvéolos corticais.

Os eventos de movimentação de íons, despolarização das membranas, e bloqueio da micrópila durante a fertilização são extremamente rápidos, todo este processo parece ser bem conservado em teleósteos, realizando o papel de evitar possíveis hibridações entre espécies (BABIN et al., 2007; KINSEY et al., 2007). A movimentação de Ca^{2+} por exemplo dura cerca de 17 segundos a após ativação cortical durante a fertilização, posteriormente a entrada do espermatozoide no oócito em *Danio rerio* (LEE et al., 1999).

A despolarização da membrana do oolema acontece com a mesma rapidez, em cerca de 20 ± 10 segundos em *Oryzias latipes*, a hipótese atribuída a este evento parece estar relacionada com o influxo de íons de Ca^{2+} e Na^{+} e o fluxo de K^{+} (MCMILLAN, 2007). Durante o processo de despolarização, novos canais podem surgir na superfície do oolema alterando a movimentação de K^{+} , primeiro pelo aumento de Ca^{2+} transitório, e posteriormente pela fusão da membrana do oolema durante a exocitose do conteúdo alveolar (KINSEY et al., 2007). Os reais efeitos do uso das diferentes soluções salinas empregadas como meio de manutenção de oócitos ainda não estão claros. Mais trabalhos devem ser realizados para preencher algumas lacunas sobre o potencial de ação causada por essas soluções durante a manutenção de gametas de peixes.

Existe um consenso geral sobre a necessidade da utilização de ACPs durante o processo de criopreservação na tentativa de evitar ou ao menos

reduzir as injúrias resultantes do congelamento (MYCOCK et al., 1995; FAHY, 2010). Entretanto o mecanismo de atuação dos ACPs ainda não está bem elucidado, refletindo em uma inadequada utilização dos mesmos (FAHY, 2010). O presente trabalho mostra uma alta sensibilidade dos oócitos de *P. lineatus* aos ACPs, principalmente ao MET, não sendo registrada viabilidade dos oócitos submetidos a este ACP. Em contraste a utilização do MET por Guan; Rawson; Zhang, (2008b) mostrou-se eficiente, evitando injurias geradas pelo congelamento mantendo a integridade das membranas externas dos oócitos de zebrafish (*Danio rerio*).

O DMSO devido a sua estrutura molecular (álcool bipolar) e o fato de ser encontrado naturalmente no organismo de várias espécies animais e vegetais possui grande aceitação como ACP na criobiologia (SOJKA et al., 1990; GUAN et al., 2008a). Sua estrutura química permite interagir-se com diferentes tipos moléculas (e.g. lipídeos, proteínas e RNAs) sem que este gere danos irreversíveis as mesmas, perfazendo a teoria de que o produto seja praticamente atóxico (SOJKA et al., 1990). De forma antagônica a atribuição de ausência de toxicidade do DMSO, Zampolla et al., (2009) avaliaram a toxicidade do DMSO em oócitos de zebrafish, relatando o aumento da replicação de DNA mitocondrial e a redução das taxas de ATP após a exposição a 2 M do crioprotetor. Os mesmos autores atribuem essas alterações a tentativa de correção do oócito do DNA mitocondrial e relatam também a ausência de replicações de DNA em concentrações acima de 3 M de DMSO.

O PG é geralmente associado a outros ACPs nos protocolos de congelamento de oócitos de mamíferos (TAN et al., 2009; COCCHIA et al., 2010) e recentemente vem sendo incorporado aos ACPs mais tradicionais empregados durante o congelamento de sêmen (NAVARRO et al., 2004) e embriões de peixes (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008). Os dados obtidos com PG no presente trabalho mostraram baixas taxas de fertilização em relação ao tratamento com DMSO, toda via o PG a 0,5 M mostrou-se mais consistência nos dados com as menores variações, apesar da ausência de análises estatísticas. Uma hipótese levantada por Wusteman et al., (2008) propõe que a toxicidade do PG é de forma secundária, em que esta substância altera a

homeostase do cálcio via bomba de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e também gera alterações na permeabilidade das mitocôndrias.

A vitrificação de oócitos e embriões de peixes teve seus principais estudos publicados somente nas últimas décadas, porém não são focos de trabalhos sistemáticos (ISAYEVA et al., 2004). Na literatura somente foram relatados sucesso no congelamento de embriões em algumas poucas espécies de peixes como o *Paralichthys olivaceus* (CHEN; TIAN, 2005). As vantagens da vitrificação em relação ao congelamento lento defendido por alguns autores (e.g. (Guan; Rawson; Zhang, 2010; Isayeva; Zhang; Rawson, 2004) são que devido as altas taxas de resfriamento ($\sim 2.500^\circ\text{C}/\text{min.}$) a redução do tempo que o material seria exposto ao frio reduziria os problemas com a sensibilidade ao frio, reportados em oócitos de peixes por Isayeva; Zhang; Rawson, (2004) em *Danio rerio*, Sanches et al., (2014) em *Steindachneridion parahybae* e no presente estudo em *Prochilodus lineatus*.

Como segundo argumento relata-se que com a obtenção do estado vítrio gerado pelas altas concentrações das SCPs utilizadas, as chances de ocorrer a nucleação de gelo internamente (geralmente entre temperaturas de 0 a -40°C) seria minimizada. Observou-se no presente estudo uma alta sensibilidade dos oócitos a baixa temperatura a partir de 30 min. de exposição, problema que teoricamente seria contornado de forma alternativa aplicando a técnica de vitrificação. Entretanto não foi observada viabilidade nos oócitos expostos a ambos os ACPs em 6 M, 8 M e 10 M, tornando a metodologia inviável ao esbarrar na toxicidade do ACPs. Apesar da alta toxicidade dos ACPs, morfologicamente os gametas de ambos os tratamentos estavam normais, levantando a hipótese de que os crioprotetores utilizados podem inviabilizar o material em nível molecular assim como levantado por Isayeva; Zhang; Rawson (2004) e Castro et al., (2011).

Dificuldades em obter um protocolo efetivo para o congelamento de oócitos em peixes são em sua maioria atribuídos a baixa permeabilidade das membranas (ISAYEVA et al., 2004; GUAN et al., 2008a, 2010), consequentemente podendo ocorrer a formação de cristais de gelo intracelular e causar graves danos ao material. Criolesões similares as encontradas nos

oócitos de *P. linaetus* no presente estudo, foram reportadas em embriões da mesma espécie por Ninhaus-Silveira et al., (2008).

A penetração de ACPs e a permeabilidade das membranas em peixes foi estudada por Valdez-JR. et al., (2005) e Zhang et al., (2005b) em diferentes estágios de desenvolvimento de oócitos de medaka (*Oryzas latipes*) e zebrafish (*Danio rerio*) respectivamente. Os autores relatam uma redução significativa da permeabilidade das membranas em função da redução temperatura. Eventos similares foram relatados em oócitos de mamíferos (AGCA et al., 1998) e ouriços (ADAMS et al., 2003). A hipótese por trás deste evento foi levantada por Farkas et al., (2001) e implica na alteração da fluidez após a modificação das cadeias de fosfolípidos presentes nas membranas devido a redução da temperatura.

Após a exposição aos ACPs as análises morfológicas dos oócitos mostraram que o oolema desconectou-se do córion. O mesmo fato foi relatado por Zhang, et al., (2005b) em oócitos de zebrafish. A possível resposta apresentada para esse fato seria as diferentes taxas de permeabilidade entre o córion e a membrana do oolema, considerando que o córion possui uma maior permeabilidade que outras membranas, acumulando o crioprotetor onde seria o espaço perivitelino.

Devido aos diferentes graus de toxicidade apresentados pelos ACPs, a utilização de diferentes crioprotetores em conjunto vem sendo utilizado frequentemente com bons resultados (GODOY et al., 2013). Os dados desse estudo sugerem que a utilização do PG em conjunto com o DMSO possa ser uma alternativa interessante na tentativa de contornar os efeitos deletérios gerados pela toxicidade dos ACPs isolados.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por fim, podemos concluir que somente as soluções de HBSS com e sem cálcio foram efetivas na manutenção do estado não ativado nos oócitos de *P. lineatus*, impedindo a hidratação oocitária e a reação cortical. As soluções salinas não proporcionaram a extensão da viabilidade dos oócitos, permitindo a que estes continuassem a sofrer a degradação pelo tempo, somente proporcionam um meio artificial para manutenção temporária de curto prazo das características morfofisiológicas dos oócitos, podendo ser utilizada durante a manipulação dos gametas sem que estes sofram desidratação. Apesar de ambas as soluções salinas (HBSS com e sem cálcio) se mostrarem viáveis para uso, levando em conta as taxas de fertilização observadas juntamente com a importância do cálcio durante o processo de fertilização e desenvolvimento posterior do embrião, sugerimos que a utilização da solução de HBSS com cálcio possa ser mais interessante.

Podemos concluir com base nos dados obtidos que a vitrificação de oócitos de *P. lineatus* se torna inviável devido à alta sensibilidade dos gametas às molaridades mais altas dos ACPs. Apesar dos oócitos apresentarem hidratação pós descongelamento, o protocolo de congelamento lento adotado não foi capaz de manter a viabilidade morfológica dos oócitos de *P. lineatus*, e injúrias foram observadas. Lesões similares as encontradas após ao congelamento foram observadas também anteriormente a este, durante a etapa de exposição aos ACPs, levantando a hipótese que tais injúrias podem ser as mesmas, sendo geradas pelos ACPs e não pelo congelamento. Entretanto avaliações mais refinadas devem ser realizadas para elucidar se as lesões observadas no córion inviabilizam a fertilização ou como foi levantado ao longo da discussão, se a redução das taxas de fertilização dos oócitos seria a nível genômico.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, S. L.; KLEINHANS, F. W.; MLADENOV, P. V.; HESSIAN, P. A. Membrane permeability characteristics and osmotic tolerance limits of sea urchin (*Evechinus chloroticus*) eggs. **Cryobiology**, San Diego, v. 47, n. 1, p. 1–13, 2003.
- AGCA, Y.; MONSON, R. L.; NORTHEY, D. L.; et al. Normal calves from transfer of biopsied, sexed and vitrified IVP bovine embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 50, n. 1, p. 129–145, 1998.
- ANTONIO, R. R.; AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F. M. et al. Blockage of migration routes by dam construction: can migratory fish find alternative routes? **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 177–184, 2007.
- BABIN, P. J.; CERDÀ, J.; LUBZENS, E. **The fish oocyte from basic studies to biotechnological applications**. Dordrecht: Springer Science, 2007. 508 p.
- BARRERO, N. M. L.; RIBEIRO, R. P.; VARGAS, L.; et al. Caracterização genética de estoques de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes: Prochilodontidae), utilizados em programas de repovoamento: importância para a conservação da ictiofauna e do ecossistema. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 24, n. 4, p. 86–93, 2008.
- BAZZOLI, N.; GODINHO, H. P. Cortical alveoli in oocytes of freshwater neotropical teleost fish. **Bolletino di Zoologia**, v. 61, n. 4, p. 301–308, 1994. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/11250009409355899>>. Acesso em: 10 jan. 2015.
- CABRITA, E.; ROBLES, V.; CHEREGUINI, O. et al. Dimethyl sulfoxide influx in turbot embryos exposed to a vitrification protocol. **Theriogenology**, Stoneham, v. 60, n. 3, p. 463–473, 2003.
- CAPELETI, A. R.; PETRERE, M. Migration of the curimbatá *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Pisces, Prochilodontidae) at the waterfall “Cachoeira de Emas” of the Mogi-Guaçu river--São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 66, n. 2B, p. 651–659, 2006.
- CAROLSFELD, J.; GODINHO, H. P.; ZANIBONI FILHO, E.; HARVEY, B. J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, London, v. 63, n. 2, p. 472–489, 2003.
- CARVALHO, C. D. S.; FERNANDES, M. N. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish

Prochilodus lineatus. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology**, New York, v. 151, p. 437–442, 2008.

CASTRO, R. M. C. **Revisão taxonomica da familia Prochilodontidae (Ostariophysi: Characiformes)**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1990.

CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. D. A.; SILVA, C. M. G. da et al. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 39, p. 1–18, 2011.

CAVALCANTE, D. G. S. M.; MARTINEZ, C. B. R.; SOFIA, S. H. Genotoxic effects of Roundup ? on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 695, n. 1-2, p. 41–46, 2010.

CHEN, S. L.; TIAN, Y. S. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, n. 4, p. 1207–1219, 2005.

COCCHIA, N.; CIANI, F.; RUSSO, M. et al. Immature cat oocyte vitrification in open pulled straws (OPSS) using a cryoprotectant mixture. **Cryobiology**, San Diego, v. 60, n. 2, p. 229–234, 2010.

COFFMAN, M. A; GOETZ, F. W. Trout ovulatory proteins are partially responsible for the anti-proteolytic activity found in trout coelomic fluid. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 59, n. 3, p. 497–502, 1998.

COSER, A. M.; GODINHO, H.; RIBEIRO, D. Cryogenic preservation of spermatozoa from *Prochilodus scrofa* and *Salminus maxillosus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 37, p. 387-390, 1984.

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

DINNYÉS, A.; URBÁNYI, B.; BARANYAI, B.; MAGYARY, I. Chilling sensitivity of carp (*cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants: Work in progress. **Theriogenology**, Stoneham, v. 50, n. 1, p. 1–13, 1998.

FAHY, G. M. Cryoprotectant toxicity neutralization. **Cryobiology**, San Diego, v. 60, n. 3, p. S45- S53, 2010.

FARKAS, T.; FODOR, E.; KITAJKA, K.; HALVER, J. E. Response of fish membranes to environmental temperature. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 32, n. 8, p. 645–655, 2001.

FELIZARDO, V. O.; MELLO, R. A.; MURGAS, L. D. S. et al. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 122, n. 3-4, p. 259–263, 2010.

FENERICH-VERANI, N.; GODINHO, H. M.; NARAHARA, M. Y. The size composition of the eggs of curimbatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881, induced to spawn with human chorionic gonadotropin (HCG). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 37-41, 1984.

FREIRE-BRASIL, D. **Análise estrutural e ultraestrutural da maturação final do ovócito, fertilização e primeira clivagem em curimbatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836)**. 2001. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

GANECO, L. N.; FRANCESCHINI-VICENTINI, I. B.; NAKAGHI, L. S. O. Structural analysis of fertilization in the fish *Brycon orbignyanus*. **Zygote**, Cambridge, v. 17, n. 2, p. 93–99, 2009.

GILKEY, J. C. Roles of calcium and pH in activation of eggs of the medaka fish, *Oryzias latipes*. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 97, n. 3, p. 669–678, 1983.

GILKEY, J. C.; JAFFE, L. F.; RIDGWAY, E. B.; REYNOLDS, G. T. A free calcium wave traverses the activating egg of the medaka, *Oryzias latipes*. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 76, n. 2, p. 448–466, 1978.

GODINHO, A. L.; LAMAS, I. R.; GODINHO, H. P. Reproductive ecology of Brazilian freshwater fishes. **Environmental Biology of Fishes**, Dordrecht, v. 87, n. 2, p. 143–162, 2010.

GODINHO, H. P.; VIVEIROS, A. T. M. Current status of sperm cryopreservation of brazilian characiform fishes. In: TIERSCH; T. R.; GREEN, C. C. (Org.). **Cryopreservation in aquatic species**. 2. ed. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2011. p. 875–884

GODOY, L. C.; STREIT, D. P.; ZAMPOLLA, T.; BOS-MIKICH, A.; ZHANG, T. A study on the vitrification of stage III zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. **Cryobiology**, San Diego, v. 67, n. 3, p. 347–354, 2013.

GOETZ, F. W.; COFFMAN, M. A. Storage of unfertilized eggs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in artificial media. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 184, n. 3-4, p. 267–276, 2000.

GUAN, M.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes using improved controlled slow cooling protocols. **Cryobiology**, San Diego, v. 56, n. 3, p. 204–208, 2008a.

GUAN, M.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Development of a new method for isolating zebrafish oocytes (*Danio rerio*) from ovary tissue masses.

Theriogenology, Stoneham, v. 69, n. 3, p. 269–75, 2008b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17964638>>. Acesso em: 10 jan.2015.

GUAN, M.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Cryopreservation of zebrafish (*danio rerio*) oocytes by vitrification. **Cryo-Letters**, Cambridge, v. 31, n. 3, p. 230–238, 2010.

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

HAGEDORN, M.; HSU, E.; KLEINHANS, F. W.; WILDT, D. E. New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation. **Cryobiology**, San Diego, v. 34, n. 4, p. 335–347, 1997.

AGEDORN, M.; LANCE, S. L.; FONSECA, D. M.; et al. Altering fish embryos with aquaporin-3: an essential step toward successful cryopreservation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 67, n. 3, p. 961–966, 2002.

HART, N. Fertilization in teleost fishes: mechanisms of sperm–egg interactions. **International Review Cytology**, New York, v. 121, p. 1–66, 1990.

HARVEY, B.; ASHWOOD-SMITH, M. J. Cryoprotectant penetration and supercooling in the eggs of salmonid fishes. **Cryobiology**, San Diego, v. 19, n. 1, p. 29–40, 1982.

HU, J.; ZHANG, Y.; ZHOU, R. Changes in extracellular osmolality initiate sperm motility in freshwater teleost rosy barb *Puntius conchoni*. **Theriogenology**, Stoneham, v. 72, p. 704–710, 2009.

ISAYEVA, A.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. **Cryobiology**, San Diego, v. 49, n. 2, p. 114–122, 2004.

KINSEY, W. H.; SHARMA, D.; KINSEY, S. C.; Fertilization and egg activation in fishes. In: BABIN, P. J.; CERDÀ, J.; LUBZENS, E. (Org.). **The fish oocyte from basic studies to biotechnological applications**. Dordrecht: Springer Science & Business Media, 2007. p.397–411.

KUDO, S. Fertilization, cortical reaction, polyspermy preventing and anti-microbial mechanisms in fish eggs. **Bulletin of the Institute of Zoology Academy of. Science Monograph**, v. 16, p. 313–340, 1991.

LEE, K. W.; WEBB, S. E.; MILLER, A L. A wave of free cytosolic calcium traverses zebrafish eggs on activation. **Developmental Biology**, San Diego, v.

214, n. 1, p. 168–180, 1999. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10491266>>. Acesso em: 14 mar. 2014.

LINHART, O. Short-term storage of ova of common carp and tench in extenders. **Journal of Fish Biology**, London, v. 59, n. 3, p. 616–623, 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1006/jfbi.2001.1674>>. Acesso em: 14 mar. 2015. .

LINHART, O.; KUDO, S.; BILLARD, R.; SLECHTA, V.; MIKODINA, E. V. Morphology, composition and fertilization of carp eggs: a review. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 129, n. 1-4, p. 75–93, 1995.

MCMILLAN, D. B. **Fish histology**. Dordrecht: Springer, 2007. 598 p.

MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; ROSA, P. V. et al. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 177–187, 2011.

MOLLAH, M. F. A.; TAN, E. S. P. Viability of catfish (*Clarias macrocephalus*, Gunther) eggs fertilized at varying post-ovulation times. **Journal of Fish Biology**, London, v. 22, n. 5, p. 563–566, 1983. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1095-8649.1983.tb04215.x>>. Acesso em: 01 jan. 2015.

MYCOCK, D. J.; MYCOCK, D. J.; WESLEY-SMITH, J. et al. Cryopreservation of somatic emryos of four species with and without cryoprotectant pre-treatment. **Annals of Botany**, London, v. 75, p. 331–336, 1995.

NAVARRO, O. J.; VELASCO-SANTAMARÍA, Y. M.; CRUZ-CASALLAS, E. P. Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). **Revista Colombiana de Ciências Pecuária**, Medellín, v. 17, n. 4, p. 53–59, 2004.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A.; AGOSTINHO, C. A.; VERISSIMO-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.; AZEVEDO, A. DE. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote**, Cambridge, v. 14, n. 3, p. 217–229, 2006.

OHTA, T.; IWAMATSU, T.; TANAKA, M.; YOSHIMOTO, Y. Cortical alveolus breakdown in the eggs of the freshwater teleost *Rhodeus ocellatus ocellatus*. **Anatomical Record**, New York, v. 227, n. 4, p. 486–496, 1990.

PAULA, D. A. J.; MACHADO, M. R. F.; MURGAS, L. D. S. et al. Toxicity of cryoprotectants on *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837) (curimba) embryos in an experimental incubator (Characiformes: Prochilodontidae).

Neotropical Ichthyology, Porto alegre, v. 12, n. 4, p. 835–844, 2014.

Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-62252014000400835&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 10 mar. 2014.

POLGE, C.; WILLADSEN, S. M. Freezing eggs and embryos of farm animals. **Cryobiology**, San Diego, v. 15, n. 3, p. 370–373, 1978.

RANA, K. J.; GILMOUR, A. Cryopreservation of fish spermatozoa: effect of cooling methods on the reproducibility of cooling rates and viability. In: REFRIGERATION AND AQUACULTURE CONFERENCE, 1996, Bordeaux. **Conference of the...** Bordeaux: [s.n.], 1996. p.3.

RIME, H.; GUITTON, N.; PINEAU, C. et al. Post-ovulatory ageing and egg quality: a proteomic analysis of rainbow trout coelomic fluid. **Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E**, London, v. 2, p. 26, 2004.

RIZZO, E.; GODINHO, H. P.; SATO, Y. Short-term storage of oocytes from the neotropical teleost fish *Prochilodus marggravii*. **Theriogenology**, Stoneham, v. 60, n. 6, p. 1059–1070, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X03001080>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

ROBERTS, C. M.; MCCLEAN, C. J.; VERON, J. E. N. et al. Marine biodiversity hotspots and conservation priorities for tropical reefs. **Science**, New York, v. 295, n. 5558, p. 1280–1284, 2002.

ROBLES, V.; CABRITA, E.; PAZ, P. de. et al. Effect of a vitrification protocol on the lactate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities and the hatching rates of Zebrafish (*Danio rerio*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 61, n. 7-8, p. 1367–1379, 2004.

RUNFT, L. L.; JAFFE, L. A.; MEHLMANN, L. M. Egg activation at fertilization: where it all begins. **Developmental Biology**, San Diego, v. 245, n. 2, p. 237–254, 2002.

SAKAI, N.; BURGESS, S.; HOPKINS, N. Delayed in vitro fertilization of zebrafish eggs in Hank's saline containing bovine serum albumin. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, Cambridge, v. 6, n. 2, p. 84–87, 1997.

SANCHES, E. A.; OKAWARA, R. Y.; CANEPPELE, D. et al. Storage of *Steindachneridion parahybae* oocytes at different temperatures. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 151, n. 3-4, p. 262–268, 2014.

Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432014003029>>. .

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

SIGMA-ALDRICH. Ficha de informações de segurança de produtos químicos: DIMETILSULFÓXIDO. , 2012.

SMOLDERS, A. J. P.; GUERRERO HIZA, M. A.; VELDE, G. van der; ROELOFS, J. G. M. Dynamics of discharge, sediment transport, heavy metal pollution and Sabalo (*Prochilodus lineatus*) catches in the lower Pilcomayo river (Bolivia). **River Research and Applications**, Chichester, v. 18, n. 5, p. 415–427, 2002.

SOJKA, J. E.; BRISSON-KIMMICK, S. V.; CARLSON, G. P.; COPPOC, G. L. Dimethyl Sulfoxide update: new applications and dosing methods. In: **Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, New York, v. 36, p. 683-690, 1990.

STOSS, J. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: HOAR, E. M.; RANDALL, W. S.; DONALDSON, D. J. (Org.); **Fish physiology**. New York: Academic Press, 1983. p.306–350.

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

STREIT-JR, D. P.; GODOY, L. C. DE; RIBEIRO, R. P. et al. Cryopreservation of embryos and oocytes of south american fish species. In: YAMASHIRO, H. (Ed.). **Recent advances in cryopreservation**. Croacia: InTech Open, 2014. p. 45-58. Disponível em: < <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/47008.pdf>>. Acesso em: 22 mar. 2015.

SUZUKI, T.; KOMADA, H.; TAKAI, R.; KEIJI, A.; KOZIMA, T. T. Relation between toxicity of cryoprotectant DMSO and its concentration in several fish embryos. **Fish Science**, New York, v. 61, n. 2, p. 193–197, 1994.

TAN, X.; SONG, E.; LIU, X.; YOU, W.; WAN, F. Factors affecting the survival, fertilization, and embryonic development of mouse oocytes after vitrification using glass capillaries. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal**, Columbia, v. 45, n. 8, p. 420–429, 2009.

TOKUMOTO, T.; TOKUMOTO, M.; HORIGUCHI, R.; ISHIKAWA, K.; NAGAHAMA, Y. Diethylstilbestrol induces fish oocyte maturation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 10, p. 3686–3690, 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=373523&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 abr. 2014.

TOKUMOTO, T.; YAMAGUCHI, T.; II, S.; TOKUMOTO, M. In vivo induction of oocyte maturation and ovulation in zebrafish. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 9, p. e25206, 2011.

VALDEZ-JR., D. M.; MIYAMOTO, A.; HARA, T. et al. Water and cryoprotectant permeability of mature and immature oocytes in the medaka (*Oryzias latipes*). **Cryobiology**, San Diego, v. 50, p. 93–102, 2005.

VARI, R. P.; MALABARBA, L. R. Neotropical ichthyology: an overview. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**, v. 1, p. 1-12, 1998.

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: UDUEM, 1996. 169 p.

VIVEIROS, A. T. M.; AMARAL, T. B.; ORFÃO, L. H. et al. Sperm cryopreservation of tiete tetra *Brycon insignis* (Characiformes): Effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, p. 858–865, 2011.

VIVEIROS, A. T. M.; NASCIMENTO, A. F.; ORFÃO, L. H.; ISAÚ, Z. A. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**, Stoneham, v. 74, n. 4, p. 551–556, 2010.

VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; MARIA, A. N.; ALLAMAN, I. B. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 112, p. 293–300, 2009.

WALTERS, E. M.; BENSON, J. D.; WOODS, E. J.; CRITSER, J. K. The history of sperm cryopreservation. In: ALLAN, M. J.; PACEY, T. A. (Org.). **Sperm banking: theory and practice**. Cambridge: Cambridge University Press, 2009, p.128.

WUSTEMAN, M.; RAUEN, U.; SIMMONDS, J.; HUNDS, N.; PEGG, D. E. Reduction of cryoprotectant toxicity in cells in suspension by use of a sodium-free vehicle solution. **Cryobiology**, San Diego, v. 56, n. 1, p. 72–79, 2008.

YAMASHIRO, H.; HAN, Y.-J.; SUGAWARA, A.; et al. Freezability of rat epididymal sperm induced by raffinose in modified Krebs-Ringer bicarbonate (mKRB) based extender solution. **Cryobiology**, San Diego, v. 55, n. 3, p. 285–294, 2007.

YANG, H.; HAZLEWOOD, L.; WALTER, R. B.; TIERSCH, T. R. Effect of osmotic immobilization on refrigerated storage and cryopreservation of sperm from a viviparous fish, the green swordtail *Xiphophorus helleri*. **Cryobiology**, San Diego, v. 52, n. 2, p. 209–218, 2006.

YASUI, G. S.; FUJIMOTO, T.; ARAI, K. Restoration of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*, from cryopreserved diploid sperm and induced androgenesis. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 308, p. S140–S144, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.05.041>>. Acesso em: 12 mar. 2014.

ZAMPOLLA, T.; SPIKINGS, E.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Effect of methanol and Me₂SO exposure on mitochondrial activity and distribution in stage III ovarian follicles of zebrafish (*Danio rerio*). **Cryobiology**, San Diego, v. 59, n. 2, p. 188–194, 2009.

ZHANG, T.; ISAYEVA, A.; ADAMS, S. L.; RAWSON, D. M. Studies on membrane permeability of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes in the presence of different cryoprotectants. **Cryobiology**, San Diego, v. 50, p. 285–293, 2005a.

ZHANG, T.; ISAYEVA, A.; ADAMS, S. L.; RAWSON, D. M. Studies on membrane permeability of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes in the presence of different cryoprotectants. **Cryobiology**, San Diego, v. 50, n. 3, p. 285–293, 2005b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15925580>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) Embryos. **Cryobiology**, San Diego, v. 32, n. 3, p. 239–246, 1995. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011224085710231>>. Acesso em: 15 jan. 2015.

ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Cryo-conservation in fish: the potentials and challenges. **Cryobiology**, San Diego, v. 55, n. 3, p. 354, 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011224007002398>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

ZHANG, T.; RAWSON, D. M.; TOSTI, L.; CARNEVALI, O. Cathepsin activities and membrane integrity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes after freezing to À 196 ° C using controlled slow cooling q. **Cryobiology**, San Diego, v. 56, p. 138–143, 2008.