

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 31/03/2019.



CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

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

Raphael da Silva Costa

DOUTORADO



PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL

Biologia
Estrutural

Raphael da Silva Costa.

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

Submetidos a Eletroporação e ao Ultrassom.

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

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Ninhaus Silveira

São José do Rio Preto

2017

Costa, Raphael da Silva.

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

231 f. : il., tabs.

Orientador: Alexandre Ninhaus Silveira

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

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

CDU – 597

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

Raphael da Silva Costa.

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

Submetidos a Eletroporação e ao Ultrassom.

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

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

Comissão Examinadora

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

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

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

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

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

São José do Rio Preto- SP

28 de fevereiro de 2017

DEDICO

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

AGRADECIMENTOS

A Deus e a espiritualidade.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

"Coisa errada, não é uma coisa certa! ”

Luiza Gamero Costa, 3 anos.

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

*In the present thesis, new protocols of vitrification for embryos of *Prochilodus lineatus* were studied, using sonophoresis (ultrasound), polarized electric field and the incorporation of polyunsaturated fatty acids into the embryonic membranes, aiming to increase the embryonic permeability and its mechanical resistance. Thus, the results of this study are presented and organized in eight chapters: Chapter 1, the embryonic sensitivity to six internal cryoprotectants was evaluated (dimethylsulfoxide- Me_2SO_4 , dimethylacetamide-DMA, dimethylformamide-DMF, methanol-MET, glycerol-GLY and 1,2-Propanediol-PROP) at concentrations of 1 to 6M; and to two external cryoprotectants (sucrose-SUC and glucose-GLU) at concentrations of 0.1 to 1M; It was defined that the isolated use of Prop 6M as the best option, since it allows the formation of a vitreous solid with low toxicity. In Chapter 2, the effect of the cryoprotectants on the embryonic development of *P. lineatus* was evaluated, standardizing five classes of morphological anomalies, based on the Gaussian distribution of the morphometry of twenty normal larvae. It was not possible to find specificity between the classes of anomalies and the cryoprotectants. This work cycle was concluded with Chapter 3, which aimed to promote embryonic vitrification using the Prop-6M solution. The embryos were vitrified effectively, however there was no embryonic survival. Thus, a new cycle in search for increased embryo permeability started with Chapter 4, which evaluated the effects of pulsed ultrasound field (1MHz) on embryonic development of *P. lineatus*, supported by identifying a maximum energy density. Defining that the use of the ultrasonic fields (1Mhz) is feasible using pulses of 16Hz with a total energy density up to 1.12W/cm². In Chapter 5, were evaluated the effects of the polarized electric field on embryonic development, identifying a maximum energy density supported. The embryos showed low survival, as a result of high sensitivity. As a way of evaluating the results obtained in the previous chapters, Chapter 6 promoted vitrification using the Prop 6M (Prop) solution associated with ultrasound (1.2 Joule) and polarized electric field (0.4 and 1.7 Joule). Concluding, again the results showed that the vitrification process occurs effectively, however, the embryos do not resist to the stress of the vitrification and heating methodologies. In this way, Chapter 7 offered us a new guideline, incorporating long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) in the embryonic membranes, with the objective of increasing permeability and resistance to electric fields. It was verified that it is possible to alter the phospholipid profile of the embryonic membranes and their plasticity, making the embryo more sensitive to cryoprotectants and more resistant to the polarized electric field.*

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

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

LISTA DE SIMBOLOS

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

SUMÁRIO

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

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

INTRODUÇÃO GERAL

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

32

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

Bibliografia

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CONCLUSÕES GERAIS.

Conclui-se que:

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