



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL



**Viabilidade de embriões de piracanjuba
(*Brycon orbignyanus*) submetidos a diferentes
protocolos de resfriamento**

Maria do Carmo Faria Paes
Bióloga

**Jaboticabal - SP
2013**


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

**Viabilidade de embriões de piracanjuba
(*Brycon orbignyanus*) submetidos a diferentes
protocolos de resfriamento**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura, do Centro de Aquicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Aquicultura.

Maria do Carmo Faria Paes
Orientadora: Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi

**Jaboticabal
São Paulo - Brasil
2013**



*Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza de que muito pouco sei, eu nada sei*

*Conhecer as manhas e as manhãs
O sabor das massas e das maçãs
É preciso amor pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir é preciso a chuva para florir*

*Penso que cumprir a vida seja simplesmente
Compreender a marcha e ir tocando em frente
Como um velho boiadeiro levando a boiada
Eu vou tocando os dias pela longa estrada, eu vou
Estrada eu sou...*

*Todo mundo ama um dia, todo mundo chora
Um dia a gente chega e no outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz e ser feliz...*

Tocando em frente

(Almir Sater e Renato Teixeira)

À Deus

*por ouvir minhas preces, por estar ao meu lado em cada lágrima
derramada, mas também em cada vitória alcançada,
por ter me dado força e coragem para nunca desistir.*

Aos meus pais,

***Luzia e José Paes** por terem me dado a vida, pelo amor, por
cada oração, por suportarem a distância, por lutar e torcer
muito por mim... amo vocês!*

Aos meus irmãos que eu amo tanto,

Letícia, João Bosco e Domingos Paes

pelo carinho e apoio nos momentos difíceis.

*Ao meu namorado **Kauê Velho**
pelo amor, carinho e paciência.*

*Aos meus velhos amigos dos
quais nunca me esqueci e, que
mesmo longe sempre estiveram
presentes. Aos novos amigos
conquistados que levarei para
sempre no meu coração. Sem
vocês não sou ninguém!*

Ofereço e Dedico

*"O valor das coisas não está no tempo
em que elas duram, mas na
intensidade em que elas acontecem..."*

*Por isso existem momentos
inesquecíveis, coisas inexplicáveis e
pessoas incomparáveis..."*

(Fernando Pessoa)

À

Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi,

Pela qual tenho imensa admiração e na qual eu me inspiro a cada dia, pois é um exemplo a ser seguido... Um exemplo de mulher, de mãe, de pessoa, de caráter, de profissional, de competência e de sabedoria...

Te agradeço por todos esses anos de convívio no laboratório e fora dele, pela parceria, pela amizade, por ter acreditado em mim e em meus sonhos... por partilhar minhas vitórias, minhas dificuldades e minhas derrotas... por me ensinar os caminhos da pesquisa e a me ensinar a ser uma pessoa melhor... por ter sido muito mais que uma orientadora, ser amiga, professora, conselheira, companheira de viagem, mãe... Muito obrigada por estar sempre ao meu lado, nos momentos mais difíceis da minha vida, mas também nos mais felizes... Levar-te-ei sempre em meus pensamentos e em meu coração.

Minha eterna gratidão!

*“Se eu morrer antes de você, acho que não vou estranhar o céu
Ser seu amigo, já é um pedaço dele...”
(Chico Xavier)*

*“Não fiz o melhor, mas fiz tudo para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas não sou o que era antes.”
(Martin Luther King)*

Minha Homenagem

Agradecimentos Especiais

À minha co-orientadora Profa. Dra. Tiantian Zhang, por me aceitar em sua equipe, pela simpatia, ensinamentos e modelo de pessoa e de pesquisadora...

À família Okada Nakaghi pelos ótimos momentos, pelo carinho e por me “emprestar” a mãe por tantas vezes...

À família Velho por me acolher, pelo carinho, pelo amor, pelo convívio... amo muito vocês!

À todos os colegas de laboratório desses últimos anos... vocês são inesquecíveis! Aos atuais orientados: Fran, Fer, Lilian, Rê, Nivaldo, Cléo, Matheus, Breno e Marcelo... Muito mais que uma equipe de trabalho, minha segunda família!

À todos os amigos que me ajudaram nas coletas, por partilhar madrugadas de trabalho, longas viagens e comida ruim... sem vocês nada disso seria real!

Ao amigo Leandro Godoy pela amizade, boa vontade e por ter me ajudado tantas vezes que precisei...

À minha família Balalaika: Fer, Dedé, Rê, Betinho, Lê, Fer, Fran, Undine, Maria e todas as pessoas maravilhosas que passaram por lá... obrigada pelo tempo de convívio, por todos os momentos tristes e felizes, por nossa amizade, companhia, conselhos, cervejas, escondidinhos, churrascos... Amo vocês demais! Vocês tornaram minha caminhada mais suave... Jamais me esquecerei de vocês!

A todos que fazem parte da minha vida ou que cruzaram meu caminho e que de alguma forma contribuíram para a realização dos meus sonhos, o meu muito obrigada!

Agradecimentos

- ✓ *À minha orientadora Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi, por me orientar na execução deste trabalho, pelos ensinamentos e pelo apoio.*
- ✓ *Às Profas. Dras. Tiantian Zhang e Emma Spikings pela orientação, oportunidade, ensinamento e honra em me deixar fazer parte do LIRANS.*
- ✓ *Ao Dr. José Augusto Senhorini pela imensa boa vontade, parceria, ajuda... por fornecer os peixes, por disponibilizar as instalações do CEPTA/ICMBio – Pirassununga, SP e também pelas valiosas sugestões na ocasião da qualificação.*
- ✓ *Ao prof. Dr. Alexandre Ninhaus Silveira pelas valiosas sugestões na ocasião da qualificação e defesa.*
- ✓ *Ao Dr. Darci Carlos Fornari por toda ajuda e valiosas sugestões na ocasião da defesa.*
- ✓ *Ao Prof. Dr. Sérgio Fonseca Zaiden pela amizade, pelas valiosas sugestões na ocasião da defesa, pela pessoa maravilhosa e iluminada que é!*
- ✓ *À Dra. Lilian Cristina Makino pelas valiosas sugestões na ocasião da defesa, pela carinho, companheirismo nesses anos todos de convívio e por me dar a honra em ser sua amiga!*
- ✓ *Ao prof. Dr. João Ademir pela ajuda com as análises estatísticas.*
- ✓ *Ao Jefferson Ossipi e Edmilson pela imensa boa vontade, parceria, pela ajuda, por fornecer os peixes e por disponibilizar as instalações da piscicultura da Duke Energy International, Salto Grande – SP.*
- ✓ *Ao histotécnico Sr. Orandi Mateus, pelo auxílio no processamento das lâminas e também pela amizade e pelo convívio ao longo desses anos...*
- ✓ *Aos técnicos do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina da USP/Ribeirão Preto, Tereza e José, pela gentileza e ajuda.*
- ✓ *Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento pela bolsa e apoio financeiro concedido (Processo núm. 140730/2009-5).*
- ✓ *À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa e apoio financeiro concedido (Processo núm. 2009/12340-5).*
- ✓ *À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa PDSE concedida (Proc. núm. 6365-11-2).*
- ✓ *Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP, por permitir a realização deste trabalho.*

- ✓ *À todos os amigos, professores e funcionários do CAUNESP.*
- ✓ *Ao pessoal do Laboratório de Histologia e Embriologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV, minha segunda casa!*
- ✓ *Ao pessoal do LIRANS, funcionários, alunos e professores, em especial ao Kunjan Desai, por me receberem em Luton e me ensinarem muito!*

À todos que cruzaram meu caminho e de alguma forma contribuíram para meu sucesso, meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| LISTA DE TABELAS | 03 |
| LISTA DE FIGURAS | 04 |
| RESUMO | 05 |
| ABSTRACT | 06 |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 07 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 09 |
| 2.1. Espécie em estudo | 09 |
| 2.2. Reprodução e desenvolvimento embrionário de peixes ... | 10 |
| 2.3. Técnicas de criopreservação e crioprotetores | 13 |
| 2.4. Biotecnologia do resfriamento de embriões | 15 |
| 3. OBJETIVO | 17 |
| 3.1. Objetivo geral | 17 |
| 3.2. Objetivos específicos | 17 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 18 |
| 4.1. Local | 18 |
| 4.2. Obtenção dos embriões | 18 |
| 4.3. Fase do desenvolvimento | 20 |
| 4.4. Protocolos de crioprotetores utilizados | 21 |
| 4.5. Exposição dos embriões aos crioprotetores | 21 |
| 4.6. Resfriamento | 22 |
| 4.6.1. Temperaturas e tempos de estocagem | 21 |
| 4.7. Análise de eclosão, sobrevivência e deformação | 22 |

| | |
|--|-----------|
| 4.8. Qualidade da água | 23 |
| 4.9. Análises morfológicas | 23 |
| 4.9.1. Estereomicroscópio | 23 |
| 4.9.2. Microscopia de Luz | 23 |
| 4.9.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão | 24 |
| 4.10. Análise estatística | 24 |
| 5. RESULTADOS | 25 |
| 5.1. Efeito da exposição dos embriões aos crioprotetores | 25 |
| 5.2. Resfriamento | 26 |
| 5.3. Qualidade da água | 28 |
| 5.4. Análises morfológicas | 29 |
| 6. DISCUSSÃO | 41 |
| 7. CONCLUSÕES | 46 |
| 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 47 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 48 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 - Combinações das diferentes soluções crioprotetoras utilizadas no resfriamento dos embriões de Piracanjuba | 21 |
| TABELA 2 - Porcentagem de eclosão de cada tratamento no teste de toxicidade | 25 |
| TABELA 3 - Valores médios, máximos e mínimos de larvas eclodidas nos tratamentos de 1 a 7 e controles | 26 |
| TABELA 4 - Comparação dos valores médios de eclosão e sobrevivência nas duas temperaturas testadas considerando todos os tratamentos realizados | 27 |
| TABELA 5 - Comparação dos valores médios de eclosão e sobrevivência nos tempos de estocagem de 6 e 10 horas considerando todos os tratamentos realizados | 27 |
| TABELA 6 - Valores percentuais de sobrevivência, eclosão e deformidade dentre os tratamentos | 28 |
| TABELA 7 - Valores para temperatura e oxigênio dissolvido na água das incubadoras na Duke Energy e CEPTA/ICMBio | 29 |
| TABELA 8. Valores médios de comprimento total de larvas do controle positivo e larvas submetidas ao resfriamento | 30 |
| TABELA 9. Porcentagem de larvas com desenvolvimento normal em cada tratamento e no controle positivo | 31 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 – Instalações da Duke Energy | 19 |
| FIGURA 2 – Instalações do CEPTA/ICMBio – IBAMA | 20 |
| FIGURA 3 – Estereomicrografia de embrião de <i>Brycon orbignyanus</i> em fase de fechamento do blastóporo | 20 |
| FIGURA 4 – Fotomicrografias e estereomicrografias de ovos de <i>Brycon orbignyanus</i> normais | 32 |
| FIGURA 5 – Eletronmicrografias e fotomicrografias de ovos de <i>Brycon orbignyanus</i> normal e defeituosos | 33 |
| FIGURA 6 – Fotomicrografias e eletronmicrografias de ovos de <i>Brycon orbignyanus</i> submetidos ao resfriamento mostrando aspectos do vitelo .. | 34 |
| FIGURA 7 – Estereomicrografias de ovos de <i>Brycon orbignyanus</i> mostrando blastoderme alterada | 37 |
| FIGURA 8 – Estereomicrografias da morfologia externa de larvas de <i>Brycon orbignyanus</i> normal e deformadas | 39 |
| FIGURA 9 – Fotomicrografias de larvas de <i>Brycon orbignyanus</i> com desenvolvimento normal e submetidos ao resfriamento apresentando vesícula óptica e prosencéfalo alterados | 41 |
| FIGURA 10. Fotomicrografias e eletronmicrografias de larvas de <i>Brycon orbignyanus</i> mostrando vacúolos, mitocôndrias, notocorda e conteúdo desconhecido | 40 |

RESUMO

O gênero *Brycon* tem despertado grande interesse nas instituições de pesquisa, não só pela excelente qualidade e sabor da carne, mas também por características adequadas à pesca esportiva, rápido crescimento e ganho de peso. A piracanjuba tem sofrido drástica redução dos estoques em decorrência da ação antrópica estando na lista do IBAMA de espécies ameaçadas de extinção. A criopreservação de gametas e embriões de espécies migradoras e espécies raras surge como uma alternativa para a reprodução, repovoamento, criação de banco genético, transporte e possível obtenção de larvas ao longo do ano. Assim, este trabalho teve por objetivo ampliar os conhecimentos de criogenia utilizando embriões de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), com o intuito de estabelecer um protocolo de resfriamento para ser utilizado em projetos de reprodução e conservação desta espécie. Após a obtenção dos embriões por meio de reprodução induzida, estes, quando na fase de fechamento do blastóporo, foram contados e subdivididos em parcelas, considerando como unidade experimental um tubo (*vacutainer*) contendo 100 embriões. Cada tratamento teve oito repetições. Com exceção dos grupos controles, os demais tratamentos foram submetidos a diferentes combinações e concentrações de crioprotetores (sacarose, metanol, etilenoglicol e DMSO), diferentes temperaturas ($0,0\pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e $8,0\pm 2,0^{\circ}\text{C}$) e tempos de estocagem em refrigerador (6h, 10h, 24h, 72h, 168h). Transcorridos os tempos de estocagem, os embriões foram aclimatados, reidratados e transferidos para incubadoras para monitoramento do desenvolvimento e aferições das taxas de eclosão, sobrevivência e deformidade. Para avaliar o desenvolvimento de tecidos e células após a realização do experimento, amostras foram fixadas, observadas em estereomicroscópio e também processadas e analisadas em microscopia de luz e em eletrônica de transmissão. Observou-se que os embriões que foram expostos à baixas temperaturas sofreram diversas anomalias em todos os tratamentos utilizados. Verificou-se que a temperatura e o tempo de estocagem são fatores críticos para os embriões, pois, nos tempos de 24, 72 e 168 horas não houve sobrevivência. Quando se alterou o tempo de estocagem de 6 para 10 horas, bem como a temperatura de $8,0\pm 2,0^{\circ}\text{C}$ para $0,0\pm 2,0^{\circ}\text{C}$, a mortalidade dos embriões aumentou significativamente, porém o protocolo que utilizou a combinação de Sacarose + Metanol + DMSO apresentou um satisfatório índice de sobrevivência (21%) o que pode ser considerado um resultado muito promissor para estudos de conservação da espécie.

Palavras-Chave: biotecnologia, conservação, criobiologia, peixe, reprodução, resfriamento.

ABSTRACT

The genus *Brycon* have aroused great interest of research institutions, not only for the excellent quality and flavor of the meat, but also for characteristics suited to sport fishing, quick growth and weight gain. *Piracanjuba* suffers drastic reduction in natural environment as a result of human action and is in the list of endangered species of IBAMA. The cryopreservation of gametes and embryos of migratory and rare species is an alternative to reproduction, repopulation, creating genetic database, transport of larvae and obtainment of larvae throughout the year. The aim of this study is expand the knowledge of cryogenics using embryos of *piracanjuba* (*Brycon orbignyanus*) and establishing a cooling protocol to be used in projects of reproduction and conservation of this species. After obtaining embryos from induced reproduction, those ones that were in this phase of blastopore closing, were collected, counted and divided into groups, considering as experimental unit each tube (*vacutainer*) containing 100 embryos. Each treatment had eight replications. Except for the control groups, the other treatments were subjected to different combinations and concentrations of cryoprotectants (sucrose, methanol, ethylene glycol and DMSO), different temperatures ($0,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ and $8,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) and storage time on refrigerator (6h, 10h, 24h, 72h, 168h). Elapsed times of storage, the embryos were acclimated, washed and transferred to incubators for monitoring the development of measurements and hatching rates, survival and deformity. To evaluate the development of tissues and structures after the experiment, samples were put on fixative solution and observed under stereomicroscope, and after that were processed and analyzed by light microscopy and transmission electron microscopy. It was observed that embryos which were exposed to cold temperatures experienced several anomalies in all treatments. It was found that the temperature and storage times are critical factors for embryos, because in times of 24, 72 and 168 hours there were no survivors, and when the time has changed from 6 to 10 hours, and the temperature from $8,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ to $0,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$, the mortality of embryos increased significantly. However, the protocol which utilized a combination of DMSO + Methanol + Sucrose presented a satisfactory survival rate (21%), which can be considered a very promising results for studies of *piracanjuba* conservation.

Keywords: biotechnology, conservation, cryobiology, fish, reproduction, cooling.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A constante intervenção do homem no ambiente natural influencia diretamente o hábitat de algumas espécies de peixes, principalmente aquelas que realizam migrações durante o período reprodutivo, conhecidas por espécies de piracema. A construção de grandes barragens, a poluição das águas, a pesca predatória e a preferência do consumidor têm proporcionado um declínio das populações de peixes nos ambientes naturais (GANECO, 2003; MACIEL, 2006).

O desenvolvimento da aquicultura é dependente da produção contínua de larvas. Sendo a piracanjuba um peixe migrador, com período reprodutivo restrito aos meses quentes e chuvosos, sua reprodução ocorre de forma limitada (CASTAGNOLLI, 1992), havendo a necessidade de indução artificial por hormônio para que ocorra a maturação e desova em cativeiro (WOYNAROVICH e HORVÁTH, 1983). A criopreservação pode ser uma ferramenta valiosa para se conseguir a disponibilidade de gametas e embriões o ano todo (SANSONE et al., 2005).

Segundo o IBAMA (In MMA 05/04, 2008), seis *Brycons* se encontram na “Lista de Espécies Aquáticas Ameaçadas de Extinção”. São eles: *Brycon devillei*, *Brycon insignis*, *Brycon nattereri*, *Brycon opalinus*, *Brycon orbignyanus* e *Brycon vermelha*. Este gênero possui mais de 60 espécies de peixes, dentre as quais aproximadamente 40 ocorrem na América Central e América do Sul (HOWES, 1982), difundidas desde o sul do México até a Argentina e dos rios da costa do Pacífico até a Colômbia, Equador e Peru, com o seu potencial para aquicultura sendo enfatizado há mais de duas décadas (LIMA e CASTRO, 2000).

A piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) é um peixe nativo de grande valor tanto pela excelente qualidade da carne, quanto pelo rápido crescimento e ganho de peso, fácil criação, sendo ideal para pesca esportiva devido ao seu comportamento agressivo (VAZ et al., 2000). Sofre drástica redução dos estoques em decorrência do represamento dos rios para construção e operacionalização de usinas hidrelétricas, destruição de matas ciliares, poluição, diminuição das lagoas marginais e pesca predatória (ZANIBONI-FILHO, 1999). Esta redução crítica das populações de *B. orbignyanus* é preocupante porque a diminuição do número de indivíduos e a consequente perda de diversidade genética da população, tornam-nos ainda mais vulneráveis (PANARARI-ANTUNES et al., 2011).

A criopreservação de sêmen de peixes está bem compreendida e resultados satisfatórios tem sido obtidos, inclusive para a piracanjuba (MURGAS et al., 2003;

MURGAS et al., 2004). Porém o desenvolvimento de técnicas para a criopreservação de embriões de teleósteos é oportuno e urgente. A aquicultura é ainda muito dependente das populações selvagens de peixes ou da manutenção de estoques naturais em confinamento, uma vez que estes sistemas são constantemente afetados por desastres naturais, falhas na reprodução e doenças (NINHAUS-SILVEIRA, 2004).

Ainda não há relatos de sucesso no congelamento de embriões de peixes (GODOY, 2012) e pesquisas a respeito de resfriamento podem oferecer suporte para estudos futuros. Também irão possibilitar o armazenamento e transporte de embriões a longas distâncias, tornando possível o estoque de material genético em um pequeno espaço físico e aumentando a variabilidade genética para repovoamento de rios. Espécies com maior variabilidade genética terão maiores chances de se recuperar tanto em número de indivíduos quanto com relação à resistência perante as adversidades do meio ambiente. Além disso, as técnicas e resultados provenientes da presente pesquisa servirão de base para estudos futuros visando alcançar um protocolo de resfriamento/congelamento que possibilite uma alta sobrevivência e qualidade de larvas, favorecendo a conservação e reprodução não só da piracanjuba como também de outras espécies relevantes à aquicultura e ameaçadas de extinção.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Espécie em estudo

O nome *Brycon*, que nomeia a subfamília Bryconinae, descende da palavra grega *brycho*, que significa morder ou devorar com certo barulho (GODOY, 1975 citado por BALDISSEROTTO e GOMES, 2005). Popularmente conhecida por piracanjuba ou pracanjuba (*Brycon orbignyanus*) é uma espécie nativa brasileira, reofílica, que habita águas claras e apresenta hábito alimentar onívoro (GOULDING, 1980), é originária da Bacia do Rio Paraná (NAKATANI et al., 2001) e Bacia do Rio Uuguai (CAROSFELD et al., 2003) sendo altamente dependente da vegetação de mata ciliar para sua alimentação (PANARARI-ANTUNES et al., 2011).

Possui corpo alongado, apresentando cabeça com duas grandes fontanelas e escamas, tanto abaixo quanto acima da linha lateral, muito semelhantes entre si quanto à forma. A linha lateral é completa, estando abaixo da linha mediana do corpo, sendo decurvada na parte anterior. O ventre arredondado torna o corpo fusiforme, sobretudo em formas jovens (BALDISSEROTTO e GOMES, 2005). A boca é ampla e terminal, o corpo apresenta coloração prateada com o dorso castanho escuro e nadadeira caudal de cor vermelha com uma faixa mediana negra (MACIEL, 2006). É considerado um peixe de grande porte podendo as fêmeas atingir até 80 cm de comprimento e peso vivo de 8,2 kg e os machos, 68 cm de comprimento e 3,6 kg de peso vivo, quando adultos (MACIEL, 2006).

A reprodução desta espécie ocorre durante os meses de Outubro a Janeiro (GERY et al., 1987 citado por REYNALTE-TATAJE et al., 2004), os machos atingem idade reprodutiva a partir de 2 anos e 20 cm de comprimento total, enquanto as fêmeas são capazes de se reproduzir a partir do terceiro ano e 25 cm de comprimento total (MACIEL, 2006).

Possui ovócitos esféricos, semidensos e transparentes, medindo aproximadamente $1,3 \pm 0,11$ mm no momento da extrusão (GANECO et al., 2008) e $3,46 \pm 0,29$ mm após a hidratação (REYNALTE-TATAJE et al., 2004).

A *B. orbignyanus* é apreciada não só pelo sabor e qualidade da carne, como também pela agressividade que apresenta quando fisgada na pesca esportiva (VAZ et al., 2000) e pelo rápido crescimento e ganho de peso demonstrados em criações experimentais. Estas características fazem da piracanjuba uma das espécies mais indicadas como alternativa para o desenvolvimento da piscicultura em todo o Brasil (MURGAS et al., 2003). Ainda, existe

grande interesse na utilização deste briconídeo para o repovoamento de reservatórios hidrelétricos e pisciculturas comerciais. O desenvolvimento da piscicultura com espécies nativas é de grande interesse para a conservação da biodiversidade e se constitui prioridade para o IBAMA (CONTE et al., 1995).

Esta espécie encontra-se fortemente ameaçada de extinção em virtude da construção de barragens hidrelétricas que impedem sua migração reprodutiva e também pela destruição da mata ciliar que reduz a disponibilidade de alimentos naturais (VAZ et al., 2000; GANECO, 2003). Em levantamentos realizados com peixes do Alto Uruguai entre 1995 e 2000, nenhuma piracanjuba foi capturada, assim como, nenhuma piracanjuba tem sido encontrada por pescadores nos trechos entre os Rios Itá, Canoas e Pelotas desde 1980. Esse desaparecimento da piracanjuba de grande parte da Bacia do Rio Uruguai indica que a espécie não tolera alterações no meio ambiente (CAROSFELD et al., 2003). Praticamente extinta da maior parte da bacia do alto Paraná, com registros esporádicos nos rios Grande e Paranapanema, e muito provavelmente extinto no rio Tietê (IBAMA, In MMA 05/04, 2008), a situação da piracanjuba é crítica e requer medidas urgentes para sua conservação sendo imprescindível para a espécie que a recomposição da mata ciliar e das áreas críticas relacionadas ao seu ciclo de vida (locais de desova e criadouros naturais), também sejam identificadas, protegidas e/ou recuperadas (CAROSFELD et al., 2003).

Nesse contexto, o sucesso na criopreservação de gametas e embriões de piracanjuba facilitará a reprodução, transporte e repovoamento, tanto para piscicultura em escala comercial, quanto para pesquisas, visando manter a população dos rios que sofreram com a ação antrópica atendendo, às necessidades ecológicas de conservação da espécie e também ao mercado consumidor.

2.2. Reprodução e desenvolvimento embrionário de peixes

A reprodução é o processo biológico mais importante dos organismos, já que dela depende a sobrevivência e perpetuação das espécies. Por isso, a possibilidade de controlar o ciclo reprodutivo dos peixes submetidos a condições de confinamento é um dos fatores de maior importância para assegurar o êxito da piscicultura (ROMAGOSA, 2003).

Os peixes possuem uma imensa variedade de estratégias reprodutivas. A grande maioria dos teleósteos de água doce apresenta, em geral, as mesmas características, tais como: oviparidade, que consiste na liberação dos gametas no meio aquático, portanto com fertilização externa; formação de ovócitos e espermatozóides em sexos separados;

apresentação ou não de cuidado parental, dependendo da espécie; suporte nutricional dos embriões pelo saco vitelínico para seu desenvolvimento e a eclosão larval ocorre quando esta ainda não está completamente formada (GODINHO, 2007).

O processo de reprodução inicia-se a partir do hipotálamo, glândula que, influenciada por fatores externos, inicia a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Este hormônio decapeptídeo controla a liberação das gonadotrofinas em peixes, GtH I e GtH II, que à semelhança do hormônio luteinizante de mamífero (LH) irá estimular as gônadas a produzir os esteróides que desempenham importante papel na maturação final e reprodução (CASTAGNOLLI, 1992; RANG et al., 2005).

Peixes de piracema necessitam realizar a migração reprodutiva para que ocorra a maturação dos gametas e desova. Estas espécies quando mantidas em cativeiro tem sua maturação final bloqueada e a reprodução precisa ser induzida artificialmente por meio de hormônios (WOYNAROVICH e HORVÁTH, 1983; FREIRE-BRASIL, 2001).

A indução à desova deve ser realizada na época certa que coincide com o período de reprodução. Por isso, há a necessidade de se conhecer a biologia reprodutiva e comportamental da espécie com que se pretende trabalhar (CASTAGNOLLI, 1992).

As formas de indução hormonal à reprodução se dão através da aplicação de substâncias que irão desencadear estímulos no hipotálamo desses animais ou em nível gonadal (ANDRADE e YASUI, 2003). A utilização do extrato bruto da hipófise de peixes adultos é a técnica mais utilizada para a indução hormonal da maturação final, apesar de algumas desvantagens, tais como a variabilidade na quantidade de gonadotropina presente em hipófises distintas, o que dificulta a padronização da dosagem indicada, e também os elevados preços no mercado nacional e internacional (HARVEY e CAROSFELD, 1993).

Além da reprodução, estudos sobre ovos de peixes também são de grande interesse para a aquicultura, por fornecerem subsídios para a compreensão da fisiologia dessa célula germinativa, tendo em vista a preservação de gametas, a conservação da ictiofauna e o aprimoramento de técnicas de cultivo (RIZZO e GODINHO, 2003). O padrão de superfície de ovócitos e sua morfologia constituem um importante critério para a identificação de diferentes espécies de teleósteos (RIEHL, 1980; GURAYA, 1996).

Os ovos de peixes de água doce podem ser livres ou apresentar vários graus de adesividade, sendo geralmente livres em espécies migradoras e adesivos em espécies sedentárias (SATO, 1999). Estudos mostram que as características dos ovos estão relacionadas aos padrões de comportamento reprodutivo das espécies (SAMPAIO, 2006). Geralmente espécies sedentárias apresentam algum tipo de cuidado parental, possuem ovos

grandes e desovam em menor quantidade do que aquelas que realizam migrações (PAES, 2008).

O conhecimento sobre embriões e larvas de uma espécie é de grande importância, pois constitui ferramenta útil na localização de áreas de desova e no estudo do crescimento da espécie em ambiente natural (REYNALTE-TATAJE et al., 2004). Trata-se de um processo complexo que permite estudar a ontogenia das espécies, podendo ser utilizado como objeto de experimentação em processos biotecnológicos, como bioindicadores da qualidade do ambiente e para avaliar o efeito de substâncias tóxicas sobre a fauna aquática. Portanto os embriões podem ser utilizados em uma grande variedade de estudos (FLORES et al., 2002; BOTERO et al., 2004; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006).

O desenvolvimento embrionário é um processo que se inicia com a fertilização do ovócito e vai até a eclosão das larvas (KIMMEL et al., 1995). Após a fertilização, o ovo absorve água e ocorre a formação do espaço perivitelino, com a separação do córion da membrana vitelina. Os ovos dos peixes são telolécitos, com um elevado suprimento de vitelo, do qual o embrião irá se nutrir durante a embriogênese, assim como as larvas durante algum tempo após a eclosão (NAKATANI et al., 2001).

De acordo com Woynarovich e Horvath (1983) e Nakatani et al. (2001), o desenvolvimento embrionário pode ser dividido nas seguintes fases: ovo recém-fertilizado, segmentação, blastulação, gastrulação, fechamento do blastoporo, vesícula óptica, vesícula auditiva, liberação da cauda e eclosão. Entretanto, diversas outras formas de classificação das fases do desenvolvimento embrionário de teleósteos são encontradas na literatura.

O tempo de desenvolvimento das larvas também pode variar de acordo com as condições da água de incubação, sendo influenciada principalmente pela temperatura. Reynalte-Tataje et al. (2004) verificaram larvas de piracanjuba eclodidas com 18 horas após a fertilização, em uma temperatura média de $25,0 \pm 8,0^\circ \text{C}$, já Ganeco (2003) observou eclosão com 13 horas após a fertilização a $27,0^\circ \text{C}$.

Atualmente, há diversas pesquisas relacionadas à biologia reprodutiva e ao desenvolvimento embrionário e larval de peixes em cativeiro baseadas principalmente em espécies reofílicas, tais como: *Brycon cephalus* (ROMAGOSA et al., 2001), *Brycon insignis* (ANDRADE-TALMELLI et al., 2001), *Brycon orbignyanus* (GANECO, 2003), *Pseudoplatystoma corruscans* (MARQUES, 2005), *Prochilodus lineatus* (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006), *Brycon orthotaenia*, *Leporinus obtusidens*, *Prochilodus argenteus* e *Salminus brasiliensis* (SAMPAIO, 2006), *Pseudoplatystoma corruscans* X *Pseudoplatystoma fasciatum* (FAUSTINO et al., 2007), *Brycon amazonicus* (NEUMANN,

2008), *Brycon gouldingi* (FAUSTINO et al, 2010). Porém, ainda não se tem relatos de sucesso no congelamento de embriões, apenas dados de eclosão após o resfriamento (STREIT JR et al., 2007; FORNARI, 2009).

2.3. Técnicas de criopreservação e substâncias crioprotetoras

A técnica de criopreservação de gametas e embriões é fundamental na rotina da reprodução induzida e na melhoria genética das espécies de peixe, aumentando as chances de desenvolvimento de pesquisas, sobretudo no campo genético, sendo indicada para minimizar a assincronia na maturação dos gametas e facilitar o seu transporte (MILIORINI et al., 2002). A criopreservação visa manter o metabolismo celular em estado quiescente, tornando possível a conservação de células e tecidos por tempo indeterminado (GREEN, 2005). As técnicas atuais mais utilizadas para o armazenamento dos embriões são o resfriamento, o congelamento tradicional e a vitrificação (NEVES, 2008).

A vitrificação é um método de congelamento considerado ultra-rápido. Através do uso de soluções crioprotetoras com alto grau de viscosidade e de grande velocidade de desidratação, os meios de criopreservação sofrem uma passagem do meio líquido para o estado sólido, vitrificado e amorfo, por imersão direta em nitrogênio líquido a partir da temperatura ambiente, o que potencialmente reduziria as lesões causadas nas células devido à formação interna de cristais de gelo (CABRITA et al., 2003; SANTIN et al., 2009). É a técnica de criopreservação mais recentemente desenvolvida (SANTIN et al., 2009), permitindo acelerar significativamente o processo de criopreservação do embrião sem a necessidade de um congelador programável de alto custo, tornando assim o processo menos oneroso, rápido e prático que o congelamento convencional (NIEMANN, 1991).

No congelamento convencional faz-se o congelamento de embriões a temperaturas extremamente baixas utilizando equipamentos próprios para este fim. Neste método ocorre a redução gradual da temperatura do embrião, previamente adicionado ao meio crioprotetor, até seu armazenamento no nitrogênio líquido, havendo uma velocidade de resfriamento, também denominada curva de resfriamento (GREEN, 2005). Porém esta técnica apresenta entraves como o tempo de execução do procedimento e o alto custo do equipamento utilizado (SANTIN et al., 2009). Embora apresentem fácil manuseio e maior praticidade, esses equipamentos computadorizados necessitam de um ambiente climatizado e de uma corrente elétrica estável para funcionarem em condições mínimas de segurança (REICHENBACH et al., 2008). Com embriões de teleósteos este método não têm

apresentado sucesso (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008). Rall (1993) e Rawson e Zhang (2005) também salientaram algumas características que dificultam o congelamento de ovócitos e embriões de teleósteos: grande quantidade de vitelo presente no ovo, baixa relação superfície/volume, células de grandes dimensões, a possibilidade de cada compartimento do embrião apresentar propriedades osmóticas distintas, a semi-permeabilidade das membranas que rodeiam o embrião e a alta sensibilidade à baixas temperaturas.

Há também outros fatores críticos dos processos de criopreservação, como a desidratação das células devido ao congelamento da água presente na solução que, quando começa a congelar torna o meio extracelular hipertônico fazendo com que ocorra um efluxo de água para se atingir um equilíbrio osmótico (HOLT, 2000). Outro problema a ser considerado é a formação de gelo intra e extracelular, os quais assumem formas e tamanhos irregulares, podendo afetar a estrutura de membranas e organelas, bem como a função celular (SANTIN et al., 2009).

Já a técnica de resfriamento é a que tem apresentado melhores resultados para embriões de peixe, pois estes não são submetidos a temperaturas tão baixas, portanto, não há formação de cristais de gelo nas células (AHAMMAD et al., 2003).

Contudo, qualquer que seja a técnica empregada é imprescindível a utilização de crioprotetores para submeter embriões a temperaturas abaixo de 0°C (FORNARI et al., 2011). Os crioprotetores são substâncias que protegem as organelas da exposição ao frio. Uma das principais funções dos crioprotetores é remover e/ou substituir a água intracelular (SANTIN et al., 2009). Estes solutos agem conforme sua capacidade de penetrar ou não nas células, o que permite uma classificação em dois grupos: intracelulares (metanol, DMSO, etilenoglicol, propilenoglicol, glicerol, butanodiol, entre outros) e extracelulares (glicose, sacarose, manitol, trealose, entre outros) (REICHENBACH et al., 2008). Os intracelulares são moléculas de baixo peso molecular que atravessam as membranas celulares e protegem as organelas das células durante o resfriamento, retiram água destas e diminuem a temperatura de congelamento no seu interior, impedindo a formação de cristais de gelo internamente (NIEMANN, 1991). Já os extracelulares são moléculas de alto peso molecular que não atravessam as células, mas revestem-nas externamente, estabilizando a membrana celular e também facilitam a desidratação das células e reduzem a formação de cristais de gelo (DENNISTON et al., 2000).

Diante da importância das técnicas de criogenia de embriões para conservação de espécies ameaçadas e considerando que a *Brycon orbignyanus* se encontra inserida na

categoria “em perigo” (IBAMA, In MMA 05/04, 2008), com risco muito alto de extinção num futuro próximo, esta pesquisa propôs estudar a aplicação de diferentes protocolos de resfriamento aos embriões desta espécie, contribuindo para o conhecimento a respeito dos processos de criopreservação de embriões, não só da piracanjuba, como de peixes tropicais em geral, ainda muito escassos na literatura atual.

2.4. Biotecnologia do resfriamento de embriões

O desaparecimento de espécies aquáticas causa perdas ambientais e de mercado imensuráveis para a piscicultura. O desenvolvimento de técnicas de resfriamento e criopreservação de embriões de peixes pode ser a solução para esse impacto ambiental negativo (FORNARI, 2009).

Existem muitas aplicações para o resfriamento de embriões de peixes, tais como: otimização do uso de incubadoras, transporte de embriões à locais distantes, salvamento de desovas ameaçadas por agentes poluidores e ainda conhecimento a respeito da resistência dos embriões ao frio, fornecendo base para estudos de congelamento (FORNARI, 2009).

Streit Jr. et al. (2007), Neves (2008), Fornari (2009), Lopes (2010) e Digmayer (2010) apresentaram resultados animadores utilizando diferentes protocolos de resfriamento em embriões de *Piaractus mesopotamicus*.

A criopreservação de embriões envolve uma série de processos físico-químicos complexos como curvas de resfriamento, permeabilidade dos crioprotetores nas células e compartimentos embrionários, bem como, osmolaridade, toxicidade e concentração das soluções crioprotetoras (BART, 2000).

É imprescindível para o resfriamento de embriões de peixes que os mesmos suportem a redução de temperaturas. Entretanto, o frio pode provocar injúrias nas células e/ou tecidos, devido ao rápido resfriamento ou choque térmico e, ao resfriamento lento que é comumente manifestado após longos períodos de exposição a baixas temperaturas (MORRIS e WATSON, 1984 citado por LOPES, 2010).

Além da resistência aos choques térmicos, deve-se definir qual a fase do desenvolvimento ontogenético em que os ovos permanecem íntegros, bem como qual é o efeito da exposição dos embriões aos crioprotetores (ZHANG e RAWSON, 1995; HAGEDORN et al., 1997).

Neves (2008) afirma que muitos estudos revelam que embriões em estágio de pós-gastrulação são menos sensíveis as injúrias causadas pelo frio.

Para Zhang e Rawson (1995), trabalhando com *Danio rerio*, a sensibilidade ao frio é mais elevada nos estádios iniciais de desenvolvimento embrionário devido à elevada quantidade de lipídios no embrião, dificultando a ação de proteção das substâncias crioprotetoras. Geralmente, as fases mais desenvolvidas suportam melhor a toxicidade dos crioprotetores (BART, 2000), e esta toxicidade varia conforme a espécie, a concentração, o tempo e a temperatura de exposição destes (AHAMMAD et al., 1998; ZHANG e RAWSON, 1995).

Altas concentrações de crioprotetores podem causar danos irreversíveis às células devido a sua toxicidade química. Porém, os efeitos da toxicidade podem ser minimizados através da exposição breve aos crioprotetores ou através de rápidas taxas de resfriamento (VAJTA et al., 1998). Os crioprotetores mais comumente utilizados para peixes são metanol, dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, etilenoglicol e sacarose (ZHANG et al., 1993).

O procedimento de retirada do crioprotetor durante a descongelação também deve ser levado em consideração. Esse procedimento ocorre devido a entrada da água para dentro da célula e consequente saída do crioprotetor. A diluição do crioprotetor tem como função evitar a entrada muito rápida de água na célula, pois uma redução drástica na osmolaridade levaria a lise celular (SHNEIDER e MAZUR, 1984 citado por GODOY, 2012). Este fenômeno pode ser assegurado pela adição de altas concentrações de compostos extracelulares, como a sacarose e trehalose ao meio de diluição (NEVES, 2008).

Além de todos os parâmetros já citados, outros essenciais, como tempo de estocagem, temperatura de exposição, concentração do crioprotetor, reaquecimento e rehidratação também devem ser considerados para que se tenha uma adequada entrada do composto nas células, a fim de se maximizar o sucesso da criopreservação e evitar os efeitos deletérios (ROBLES et al., 2009).

Neste contexto, esta pesquisa propôs estudar diferentes protocolos de resfriamento em embriões de piracanjuba em fase de fechamento do blastopóro (pós-gástrula), testando diferentes temperaturas, tempos de estocagem e combinação dos crioprotetores metanol, etilenoglicol, DMSO e sacarose em diferentes concentrações, afim de estabelecer a metodologia ideal para a espécie.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi o conhecimento inicial da preservação criogênica de embriões de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), com o intuito de estabelecer um protocolo de resfriamento para ser utilizado em projetos de conservação, biologia e reprodução, além de servir de base para futuros estudos de congelamento de embriões de peixes.

3.2. Objetivos específicos

De modo específico pretendeu-se avaliar:

- O efeito da exposição de embriões a diferentes protocolos de crioprotetores;
- A sensibilidade dos embriões ao frio;
- O período de estocagem dos embriões à baixas temperaturas;
- Aspectos estruturais e ultraestruturais de embriões e larvas após aplicação dos protocolos de resfriamento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local

O experimento foi conduzido na Estação de Hidrologia e Aquicultura da Duke Energy International – Geração Paranapanema, no município de Salto Grande - SP e no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais - CEPTA/ICMBio (Instituto Chico Mendes), no município de Pirassununga - SP, durante os meses de Outubro a Novembro de 2010, Outubro a Dezembro de 2011 e Novembro a Dezembro de 2012. Para análises em estereomicroscopia e microscopia de luz, as amostras foram processadas no Laboratório de Histologia e Embriologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP. Para análises em microscopia eletrônica de transmissão, as amostras foram processadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina da USP - FMRP/USP, em Ribeirão Preto - SP.

4.2. Obtenção dos embriões

Para a obtenção de embriões foram utilizados reprodutores adultos de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Figura 1A e 2B). Durante o período reprodutivo da espécie foram selecionados reprodutores que apresentavam características secundárias de maturação sexual tais como ventre abaulado e macio, para fêmeas, e vertência de sêmen e aspereza da nadadeira anal nos machos.

Na Duke Energy foram utilizados “pools” de ovos provenientes das desovas resultantes da indução hormonal de 70 reprodutores, na proporção de 1 macho para cada fêmea, divididas em 5 semanas de experimento. Considerou-se cada semana uma repetição.

As fêmeas receberam duas aplicações de extrato bruto de hipófise de carpa: uma dose de 0,5 mg / kg de peso vivo (PV), e a segunda dose de 5 mg / kg de PV, aplicada após 12 h. O machos receberam uma dose de 1 mg / kg (PV) no momento da segunda dose das fêmeas, sendo os animais mantidos em tanques de desova seminatural (Figura 1B).

Observou-se que a liberação dos gametas ocorreu com aproximadamente 170 a 180 horas-grau após a última aplicação hormonal. O tanque em forma de funil permitiu que os embriões fossem capturados em duas grandes incubadoras (Figura 1C e D) das quais os embriões foram retirados e transportados para incubadoras do tipo israelenses (Figura 1E).

No CEPTA/ICMBio os peixes foram capturados (Figura 2A), induzidos hormonalmente utilizando-se o mesmo protocolo de doses realizado para fêmeas na Duke Energy, porém, devido a facilidade de liberação de sêmen, os machos não receberam hormônio. Com aproximadamente 170 horas-grau após a segunda aplicação hormonal os peixes foram extrusados (Figuras 2C e D) e os gametas misturados delicadamente e transferidos para incubadoras (Figura 2E). Foram utilizados “pools” de ovos provenientes das desovas de aproximadamente 10 fêmeas e 20 machos, divididas em 3 semanas de experimento. Considerou-se cada semana uma repetição.



Figura 1. Duke Energy: A - Exemplar adulto de *B. orbignyanus*; B - tanque de desova seminatural; C - incubadoras de coleta de ovos; D - embriões de piracanjuba; E - incubadoras.



Figura 2. CEPTA/ICMBio: A - Captura dos peixes; B - Exemplar adulto de *B. orbignyanus*; C - Extrusão do sêmen dos machos de piracanjuba; D - Extrusão dos ovócitos das fêmeas de piracanjuba e E - Incubadoras.

4.3. Fase de desenvolvimento

Para realização do experimento, foram selecionados os embriões que se encontravam em fase de fechamento do blastóporo (WOYNAROVICH e HORVÀTH, 1983; NAKATANI et al., 2001 e GANECO, 2003), aproximadamente 140 horas-grau após a fertilização (Figura 3) e separados, com auxílio de estereomicroscópio, em grupos de 100 embriões viáveis para cada tratamento.



Figura 3. Embrião de *Brycon orbignyanus* em fase de fechamento do blastóporo.

4.4. Protocolos de crioprotetores utilizados

Os grupos de embriões foram inseridos em tubos *vacutainer* previamente etiquetados, aos quais foram adicionados 9 mL de soluções crioprotetoras. Sete diferentes combinações destas soluções foram testadas, sendo a sacarose a 0,85M, utilizada como crioprotetor extracelular em todas as combinações, e como crioprotetores intracelulares: o Metanol em três concentrações diferentes - 2,8M (9 mL); 1,4M (4,5 mL) e 0,93M (3 mL); o Etilenoglicol, em três concentrações diferentes - 1,45M (9 mL); 0,75M (4,5 mL) e 0,48M (3 mL) e o DMSO, também em três concentrações diferentes - 1,15M (9 mL); 0,57M (4,5 mL) e 0,38M (3 mL), conforme Tabela 1:

Tabela 1: Combinações das diferentes soluções crioprotetoras utilizadas no resfriamento dos embriões de piracanjuba (*B. orbignyanus*):

| Tratamentos | Crioprotetores | | | | |
|-------------|----------------|---------|---------------|-------|----------------|
| | Sacarose | Metanol | Etilenoglicol | DMSO | Água destilada |
| 1 | 17,1 % | 9 % | - | - | 73,9 % |
| 2 | 17,1 % | - | 9 % | - | 73,9 % |
| 3 | 17,1 % | - | - | 9 % | 73,9 % |
| 4 | 17,1 % | 4,5 % | 4,5 % | - | 73,9 % |
| 5 | 17,1 % | 4,5 % | - | 4,5 % | 73,9 % |
| 6 | 17,1 % | - | 4,5 % | 4,5 % | 73,9 % |
| 7 | 17,1 % | 3 % | 3 % | 3 % | 73,9 % |
| 8 | - | - | - | - | * |
| 9 | - | - | - | - | 100 % |

*Água destilada não se aplica ao tratamento 8 (controle positivo).

4.5. Exposição dos embriões aos crioprotetores

Para realização desta avaliação, 30 embriões foram expostos a cada uma das combinações de crioprotetores por 20 minutos e, posteriormente, lavados com água destilada e incubados até a eclosão para análises das taxas de sobrevivência e deformidades das larvas e sua correlação com a toxicidade do crioprotetor testado. Também foram incubados 30 embriões sem a adição de nenhum crioprotetor apenas para parâmetros de comparação de resultados (controle positivo).

4.6. Resfriamento

4.6.1. Temperaturas e tempos de estocagem

Para avaliar a sensibilidade e tempo de exposição ao frio, utilizaram-se 100 embriões para cada uma das soluções crioprotetoras mais os grupos controle, que foram chamados de tratamento 8, para o controle positivo (embriões que foram contados e transferidos diretamente para as incubadoras sem serem submetidos a qualquer crioprotetor ou resfriamento) e, tratamento 9, para o controle negativo (embriões que foram contados e transferidos diretamente para os refrigeradores sem serem submetidos a qualquer crioprotetor, contendo apenas água destilada).

Com exceção do grupo controle positivo (tratamento 8), os demais tratamentos foram submetidos a um processo de resfriamento lento. Os tubos *vacutainer* contendo os embriões mais as soluções crioprotetoras foram mantidos em um recipiente a 20,0°C durante 10 minutos, em seguida, transferidos para outro recipiente a 10,0°C durante 10 minutos, e logo após foram levados para dois refrigeradores verticais com temperatura controlada, estando um deles a 0,0±2,0°C e o outro a 8,0±2,0°C, durante 6, 10, 24, 72 e 168 horas. Transcorridos os tempos propostos os tubos *vacutainer* vedados foram retirados dos refrigeradores e colocados em banho-maria, com água da incubadora à temperatura ambiente, para serem aclimatados por 15 minutos. Posteriormente, os embriões foram retirados dos tubos, lavados com água destilada em pequenas peneiras plásticas, transferidos aleatoriamente para incubadoras experimentais devidamente identificadas e incubados à temperatura ambiente.

4.7. Análise de eclosão, sobrevivência e deformação

Ovos gorados (embriões que não sobreviveram) foram coletados e fixados assim que percebidos nas incubadoras. Segundo trabalho de Ganeco (2003), a partir de 351 horas-grau de incubação, embriões de piracanjuba já se encontraram 100% eclodidos. Assim, a coleta de larvas e embriões não eclodidos foi realizada com, aproximadamente, 252 horas-grau de incubação, a partir do momento em que os embriões foram retirados dos refrigeradores e colocados nas incubadoras, somando um total de, aproximadamente, 392 horas-grau (140 horas-grau da fertilização até fechamento do blastóporo + 252 horas-grau desde a retirada dos refrigeradores até eclosão). Foram realizados os cálculos das taxas de eclosão (larvas

que já haviam rompido o córion), de sobrevivência (larvas vivas que apresentavam batimentos cardíacos, mesmo não tendo rompido o córion) e de deformidade (larvas que se desenvolveram, mas que apresentavam algum tipo de deformidade).

4.8. Qualidade da água

A água das incubadoras foi monitorada 4 vezes ao dia quanto à temperatura e oxigênio dissolvido utilizando oxímetro modelo YSI550A.

4.9. Análises morfológicas

Todas as amostras foram previamente fixadas em solução de Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 2,5%) por 24 horas, lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4, analisadas em estereomicroscópio e processadas em microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão.

4.9.1. Estereomicroscópio

Larvas e ovos foram observados e fotomicrografados em estereomicroscópio Leica DMZ 180 acoplado à câmera digital Leica MZ8.

4.9.2. Microscopia de Luz

Para análises em microscopia de luz as amostras foram desidratadas por 24 horas em solução de álcool 80%. Lavadas duas vezes durante 30 minutos em álcool 90% e absoluto. Em seguida permaneceram 4 horas na solução de pré-infiltração de glicolmetacrilato (GMA) + etanol (1:1), 16 horas na etapa de infiltração (GMA), posteriormente, foram incluídas em GMA mais solução endurecedora dentro de histomoldes. As amostras permaneceram em estufa a 60°C por 24 horas para polimerização da resina. Os cortes foram feitos com 2µm de espessura, montados em lâminas e corados com Hematoxilina-Floxina (TOLOSA et al., 2003). Após colagem das lamínulas a análise e fotodocumentação foram realizadas em fotomicroscópio Leica DM2500, acoplado a câmera digital DFC 280 e utilizando o *software* Leica Application Suite (LAS).

4.9.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para análises em microscopia eletrônica de transmissão, as amostras foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 2 % por duas horas. Em seguida foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90% 95% e 100%). A infiltração foi feita com araldite e acetona e a inclusão em araldite dentro de histomoldes. Foram realizados cortes semifinos com 0,5 µm de espessura, com navalha de vidro, e corados com azul de toluidina a 1% em ácido bórico saturado. Os melhores cortes foram selecionados para realização dos cortes ultrafinos com 60 nm de espessura, com navalha de diamante, em seguida contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, observados e eletronicografados em microscópio eletrônico de transmissão Jeol - JEM 100CX II.

4.10. Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com nove tratamentos, cada qual dividido em oito repetições. Cada repetição foi considerada uma unidade experimental. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e os valores médios analisados foram comparados pelos métodos adequados do programa estatístico SAS, versão 9.1.

5. RESULTADOS

Na Duke Energy, onde as desovas ocorreram de forma semi-natural, ou seja, os reprodutores desovaram no tanque após as aplicações hormonais, o índice de sobrevivência destes foi de 90% e a taxa de eclosão das larvas foi, em média, 64%, portanto, melhores do que o ocorrido no CEPTA/ICMBio, onde a maioria dos reprodutores morriam após o estresse causado pela extrusão dos gametas, o que pode ter refletido na qualidade da desova, pois a taxa de eclosão das larvas foi, em média, de 39%.

5.1. Efeito da exposição dos embriões aos crioprotetores

Os resultados da exposição dos embriões aos crioprotetores foram satisfatórios conforme pode ser observado nos dados de eclosão apresentados na Tabela 2. As soluções crioprotetoras testadas, nas dosagens estabelecidas para o presente trabalho, não comprometeram a sobrevivência dos embriões e também não acarretaram deformidades nas larvas.

Tabela 2. Porcentagem de eclosão de cada tratamento.

| Tratamento | % eclosão |
|-------------------|------------------|
| 1 | 100 |
| 2 | 100 |
| 3 | 100 |
| 4 | 96 |
| 5 | 99 |
| 6 | 99 |
| 7 | 97 |
| Controle + | 100 |

5.2. Resfriamento

Considerando todas as repetições, a média percentual de eclosão para o grupo controle positivo foi de 49%, atingindo valor mínimo de 30% e máximo de 90% (Tabela 3). No grupo controle negativo, que continha apenas água destilada, 100% dos ovos goraram, mostrando ser essencial a utilização de solução crioprotetora para submeter embriões à baixas temperaturas.

Tabela 3. Valores médios, mínimos e máximos de eclosão nos tratamentos de 1 a 7 e controles positivo (8) e negativo (9).

| Tratamentos | Média (%) | Valor Mínimo (%) | Valor Máximo (%) |
|-------------|-----------|------------------|------------------|
| 1 | 3 | 0 | 26 |
| 2 | 2 | 0 | 40 |
| 3 | 7 | 0 | 80 |
| 4 | 5 | 0 | 54 |
| 5 | 10 | 0 | 59 |
| 6 | 4 | 0 | 72 |
| 7 | 5 | 0 | 53 |
| 8 | 49 | 30 | 90 |
| 9 | 0 | 0 | 0 |

O tempo de permanência em refrigerador, bem como a temperatura de resfriamento, são fatores críticos para os embriões de piracanjuba. Após o resfriamento verificou-se que com os tempos de estocagem de 24, 72 e 168 horas não houve sobrevivência, e que, os valores médios de eclosão e sobrevivência, considerando todos os tratamentos, caíram significativamente quando se aumentou o tempo de 6 para 10 horas e diminuiu-se a temperatura de $8,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ para $0,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4: Comparação dos valores médios de sobrevivência e eclosão nas duas temperaturas testadas considerando todos os tratamentos realizados.

| Temperatura | Média Sobrevivência (%) | Média Eclosão (%) |
|-------------|-------------------------|-------------------|
| 8,0±2,0°C | 20 ^a | 14 ^a |
| 0,0±2,0°C | 12 ^b | 8 ^b |

* Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 5: Comparação dos valores médios de sobrevivência e eclosão nos tempos de estocagem de 6 e 10 horas considerando todos os tratamentos realizados.

| Estocagem | Média Sobrevivência (%) | Média Eclosão (%) |
|-----------|-------------------------|-------------------|
| 6hs | 21 ^a | 14 ^a |
| 10hs | 10 ^b | 8 ^b |

* Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

É interessante ressaltar que, embora tenham sido considerados como mortos, alguns embriões não morreram imediatamente à sua retirada do refrigerador, chegando a se desenvolver em torno de 1 a 2 horas de incubação. Outros, embora vivos (apresentando batimento cardíaco, portanto considerados como sobreviventes), não chegaram a eclodir, pois não apresentavam movimentos de cauda necessários para romper o córion. Portanto, a taxa de sobrevivência apresentou maiores índices quando comparadas à taxa de eclosão. Comparando-se os valores médios dos tratamentos, independente da temperatura ou do tempo em refrigerador, notou-se que o tratamento 5 (Sacarose + Metanol + DMSO) se destacou como o protocolo que apresentou o maior índice de sobrevivência. Os demais protocolos testados não apresentaram diferença estatística entre si conforme pode ser observado na Tabela 6.

Para taxas de eclosão não houve diferenças entre os tratamentos e com relação à taxa de deformidade, observamos que, proporcionalmente, o tratamento 5 foi o que apresentou menor índice (Tabela 6).

Quando comparou-se a interação entre as variáveis testadas não houve diferenças significativas entre tratamentos, temperatura ou tempo de estocagem.

Tabela 6: Valores percentuais de sobrevivência, eclosão e deformidades dentre os tratamentos.

| Tratamentos | Média Sobrevivência (%) | Média Eclosão (%) | Média Deformidade (%) |
|-------------|----------------------------|----------------------|--------------------------|
| 1 | 8 ^c | 3 ^b | 7 ^{abc} |
| 2 | 2 ^c | 2 ^b | 1 ^c |
| 3 | 13 ^c | 7 ^b | 11 ^{abc} |
| 4 | 9 ^c | 5 ^b | 7 ^{abc} |
| 5 | 21 ^b | 10 ^b | 15 ^{ab} |
| 6 | 7 ^c | 4 ^b | 5 ^{bc} |
| 7 | 11 ^c | 5 ^b | 9 ^{abc} |
| Controle + | 54 ^a | 49 ^a | 1 ^c |

* Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

5.3. Qualidade da água

Os valores médios obtidos para temperatura e oxigênio dissolvido na água das incubadoras experimentais da Duke (cinco primeiras semanas) e do CEPTA/ICMBio (três últimas semanas) ao longo do experimento se encontram na Tabela 7:

Tabela 7. Valores médios para temperatura e oxigênio dissolvido na água das incubadoras na Duke Energy (1-5) e no CEPTA/ICMBio (6-8):

| Desovas | Temperatura | Oxigênio |
|----------------|--------------------|-----------------|
| 1 | 24,5 ± 2,0°C | 9,30 mg/L |
| 2 | 24,7 ± 2,0°C | 6,05 mg/L |
| 3 | 25,3 ± 2,0°C | 5,68 mg/L |
| 4 | 26,1 ± 2,0°C | 5,63 mg/L |
| 5 | 26,5 ± 2,0°C | 6,30 mg/L |
| 6 | 28,1 ± 2,0°C | 5,63 mg/L |
| 7 | 30,8 ± 2,0°C | 6,30 mg/L |
| 8 | 27,2 ± 2,0°C | 5,91 mg/L |

5.4. Análises morfológicas

Verificou-se que em todos os tratamentos houve larvas apresentando algum tipo de deformidade e/ou ovos gorados, inclusive no grupo controle positivo, que apresentou uma pequena porcentagem de larvas deformadas (3%) na sétima repetição, em que a temperatura média da água ultrapassou os 30,0°C.

Os ovos do grupo controle positivo, quando vivos, apresentaram coloração variando de azul a marrom, formato oval, córion íntegro (Figura 4A), células da blastoderme e camada sincicial do vitelo bem definidas com núcleo evidente (Figura 4B, C e D), vitelo em grânulos bem delimitados e em formato arredondado (Figura 5A e B).

Os ovos submetidos ao resfriamento e que não se desenvolveram apresentaram coloração opaca e esbranquiçada, formato irregular, córion íntegro (Figura 5C), em histologia, observou-se o vitelo, em algumas amostras, com aspecto de uma "massa celular" (Figura 5D) e, em outras, com grânulos em formato irregular (Figura 6A), o que também pôde ser visualizado em microscopia eletrônica de transmissão (Figura 6B) ou com conteúdo dos grânulos extravasado (Figuras 6C e D). Em algumas amostras foi possível visualizar a blastoderme de forma alterada (Figuras 7A e B) porém, na maioria das amostras analisadas, tanto a blastoderme quanto a camada sincicial de vitelo, se mostraram

totalmente danificadas misturadas ao vitelo, não sendo possível distinguir as células claramente (Figuras 7 C e D).

As larvas do grupo controle positivo apresentaram cauda solta e alongada, vesícula óptica bem formada e levemente pigmentada (Figura 8A). As que foram submetidas ao resfriamento e apresentaram deformidades, também mostraram diferenças no padrão de tamanho quando comparadas às larvas do grupo controle positivo (com desenvolvimento normal), sendo que a grande maioria eram menores que as normais, uma pequena porcentagem eram maiores e, as larvas submetidas ao resfriamento, mas que não apresentaram danos, apresentaram comprimento médio total próximo ao das larvas do controle positivo (Tabela 8).

Tabela 8. Valores médios de comprimento total (em mm) de larvas do controle positivo, larvas submetidas ao resfriamento maiores, menores e normais.

| Comprimento total (mm) | | | |
|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Tratamentos | Larvas maiores | Larvas menores | Larvas normais |
| Controle positivo | 1,68±0,41 | 1,59±0,39 | 1,63±0,40 |
| 1 | 2,10±0,43 | 0,98±0,42 | 1,65±0,60 |
| 2 | 2,17±0,50 | 1,22±0,25 | 1,64±0,41 |
| 3 | 1,88±0,33 | 1,35±0,60 | 1,63±0,39 |
| 4 | 2,08±0,35 | 1,28±0,40 | 1,62±0,42 |
| 5 | 2,12±0,41 | 1,31±0,33 | 1,66±0,40 |
| 6 | 2,73±0,80 | 1,41±0,25 | 1,61±0,38 |
| 7 | 2,11±0,42 | 1,29±0,32 | 1,64±0,39 |

Observou-se que a variação no tamanho das larvas do grupo controle positivo foi pequeno, considerou-se larvas "normais" o comprimento total apresentado pela grande maioria, visto que no grupo controle positivo praticamente todas as larvas se apresentaram sem deformidades estruturais. Nas larvas submetidas ao resfriamento a variação de tamanho foi grande chegando até a 1,32 mm no tratamento 6.

As principais deformidades notadas foram principalmente relacionadas à formação do sistema nervoso e coluna vertebral. Lordose, escoliose, cifose, má formação da cauda,

que se apresentava curta ou sinuosa, sendo uma barreira à eclosão já que a larva não conseguia se movimentar adequadamente para romper o córion, além de, retração do vitelo, microcefalia e macrocefalia (Figuras 8 B, C, D, E, F, G e H).

Em microscopia de luz, as larvas normais, possuíam vitelo íntegro, prosencéfalo e vesícula ótica com desenvolvimento normal e notocorda organizada, com vacúolos grandes (Figuras 9A, B e 10D), porém na maioria das larvas deformadas, para todos os tratamentos testados, notou-se que embora o vitelo tenha permanecido com suas membranas intactas e seu conteúdo aparentemente normal, a vesícula óptica se mostrou pouco desenvolvida, ou mal formada, em posição anatômica aversa ao padrão de desenvolvimento e o prosencéfalo, bem como a notocorda, apresentaram-se anormais (Figuras 9 C, D, E e F e 10C).

Constatou-se, em algumas amostras, que as células da região da cabeça possuíam a membrana plasmática rompida embora a membrana nuclear e as organelas estivessem intactas. Observou-se também a presença de um grande número de vacúolos e mitocôndrias em células da região entre o embrião e o vitelo (Figura 10A e B), e um tipo de conteúdo desconhecido, de aspecto coloidal, tanto entre os grânulos de vitelo, quanto inter e intra células, por toda extensão da larva (Figuras 10 E e F). Conforme a Tabela 9, podemos observar que em cada tratamento, uma porcentagem de larvas submetidas ao resfriamento não apresentaram quaisquer deformidades macroscopicamente, e estas também não as apresentaram microscopicamente, sendo uma indicação de que aparentemente, o desenvolvimento destas larvas ocorreria de maneira saudável.

Tabela 9: Porcentagem de larvas com desenvolvimento normal em cada tratamento e no controle positivo.

| Tratamentos | % de Larvas normais |
|--------------------------|----------------------------|
| 1 | 1 |
| 2 | 1 |
| 3 | 2 |
| 4 | 2 |
| 5 | 6 |
| 6 | 2 |
| 7 | 2 |
| Controle positivo | 53 |

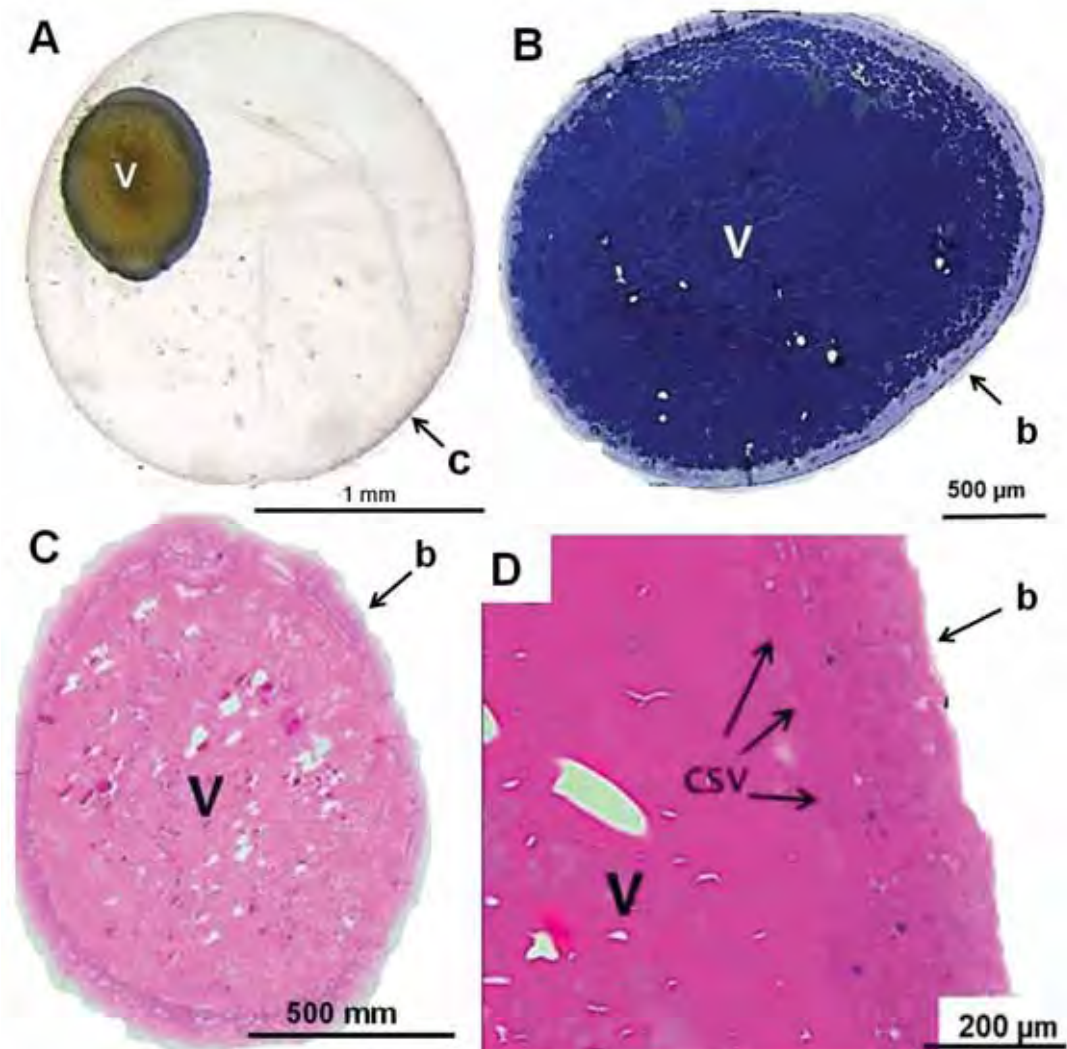


Figura 4. Estereomicrografia e fotomicrografias de ovos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*): com desenvolvimento normal sendo possível a visualização das células da blastoderme e da camada sincicial de vitelo, bem como vitelo em glóbulos arredondados (controle positivo). (V - vitelo, b- blastoderme, c - córion) Coloração: B – Azul de Toluidina; C e D – Hematoxilina-Floxina.

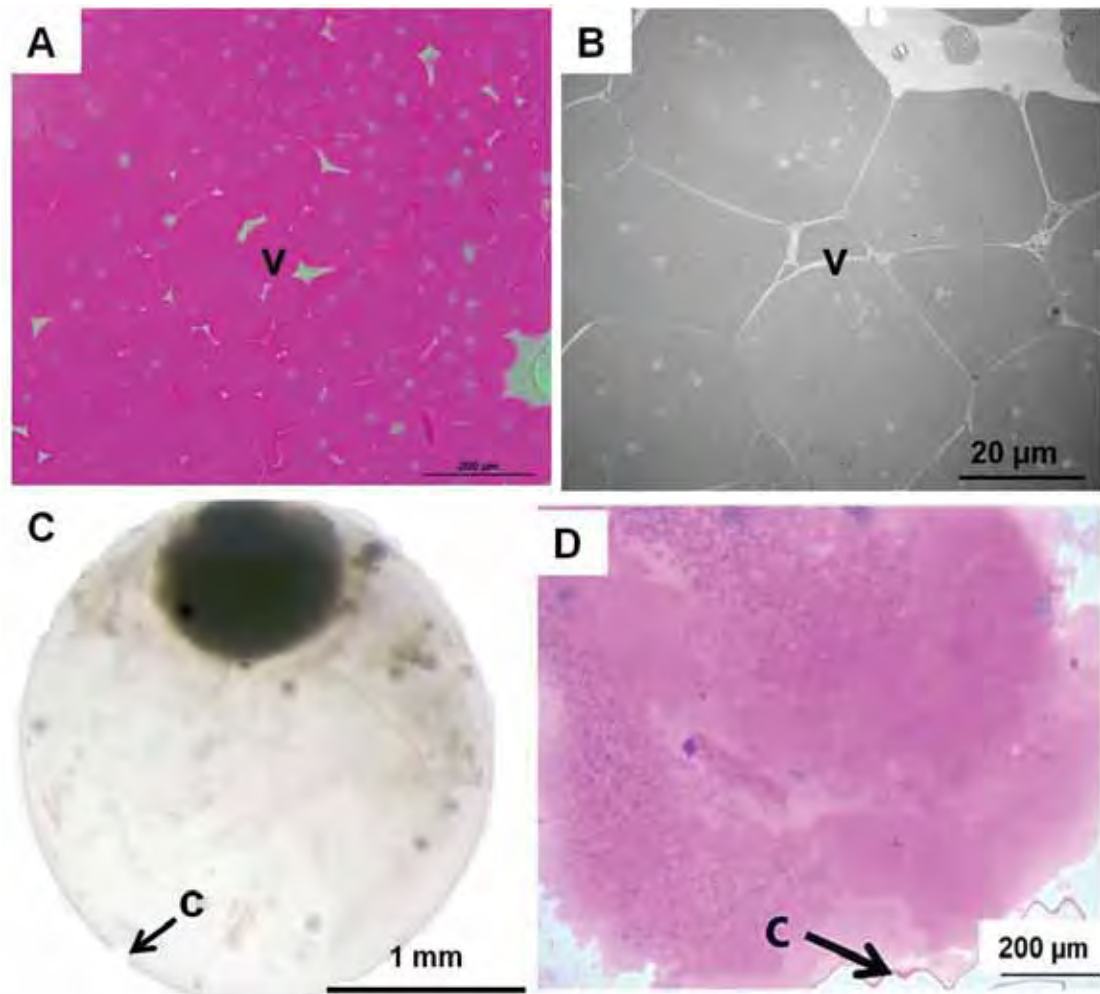


Figura 5. Estereomicrografia, eletrnmicrografia e fotomicrografias de ovos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*): A e B – com desenvolvimento normal (controle positivo); C - ovo gorado visto em estereomicroscópio; D - submetido ao resfriamento com blastoderme e vitelo indefinido porém, com córion íntegro (tratamento 2, 0,0±2,0°C, 10hrs) (V - vitelo; c – córion). Coloração: A, B e D – Hematoxilina-Floxina.

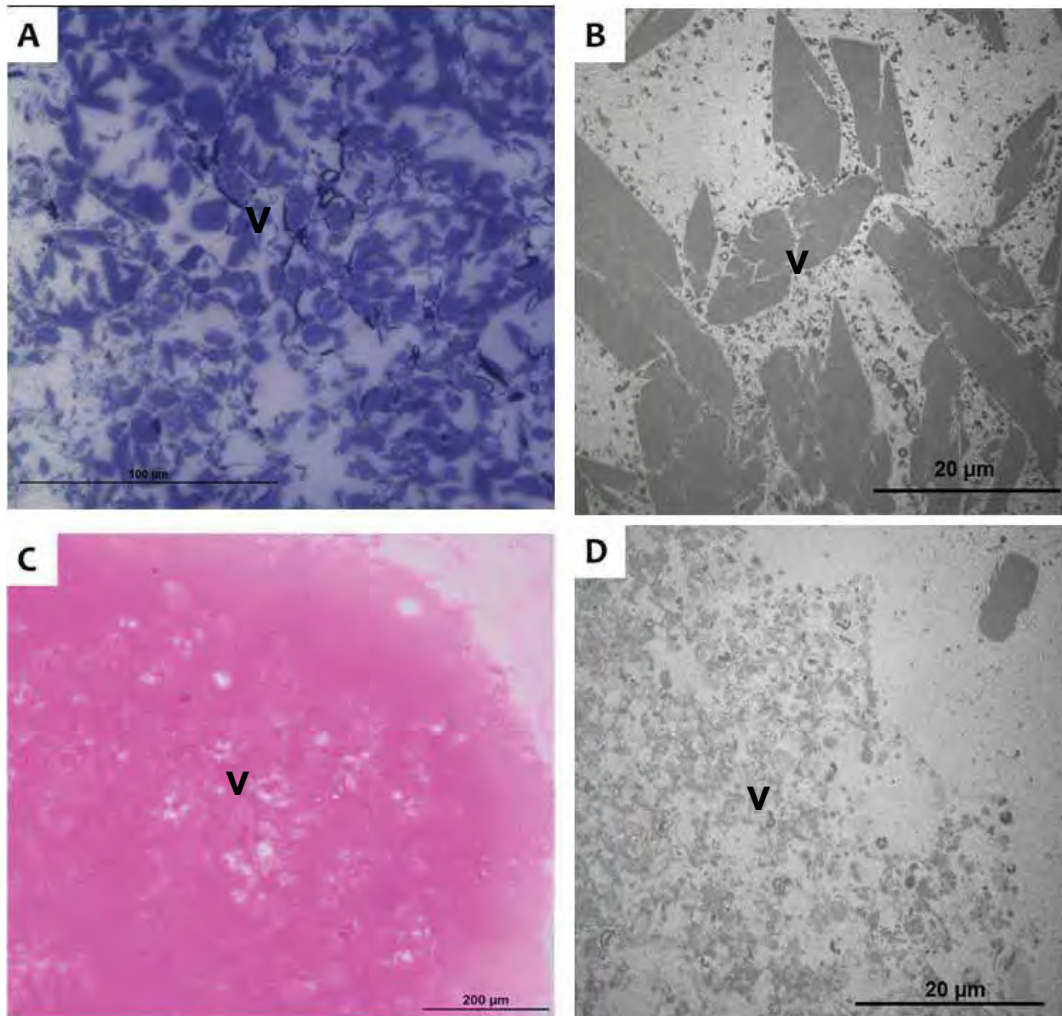


Figura 6. Fotomicrografias (A e C) e eletronicografias (B e D) de ovos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*): A e B - submetidos ao resfriamento com vitelo apresentando aspecto alterado (tratamento 1, $0\pm 2^{\circ}\text{C}$, 10hrs); C e D - submetidos ao resfriamento apresentando vitelo com conteúdo extravasado (tratamento 2, $8\pm 2^{\circ}\text{C}$, 10hrs; tratamento 1, $0\pm 2^{\circ}\text{C}$, 10hrs, respectivamente). (V - vitelo) Coloração: A - Azul de Toluidina; C - Hematoxilina-Floxina.

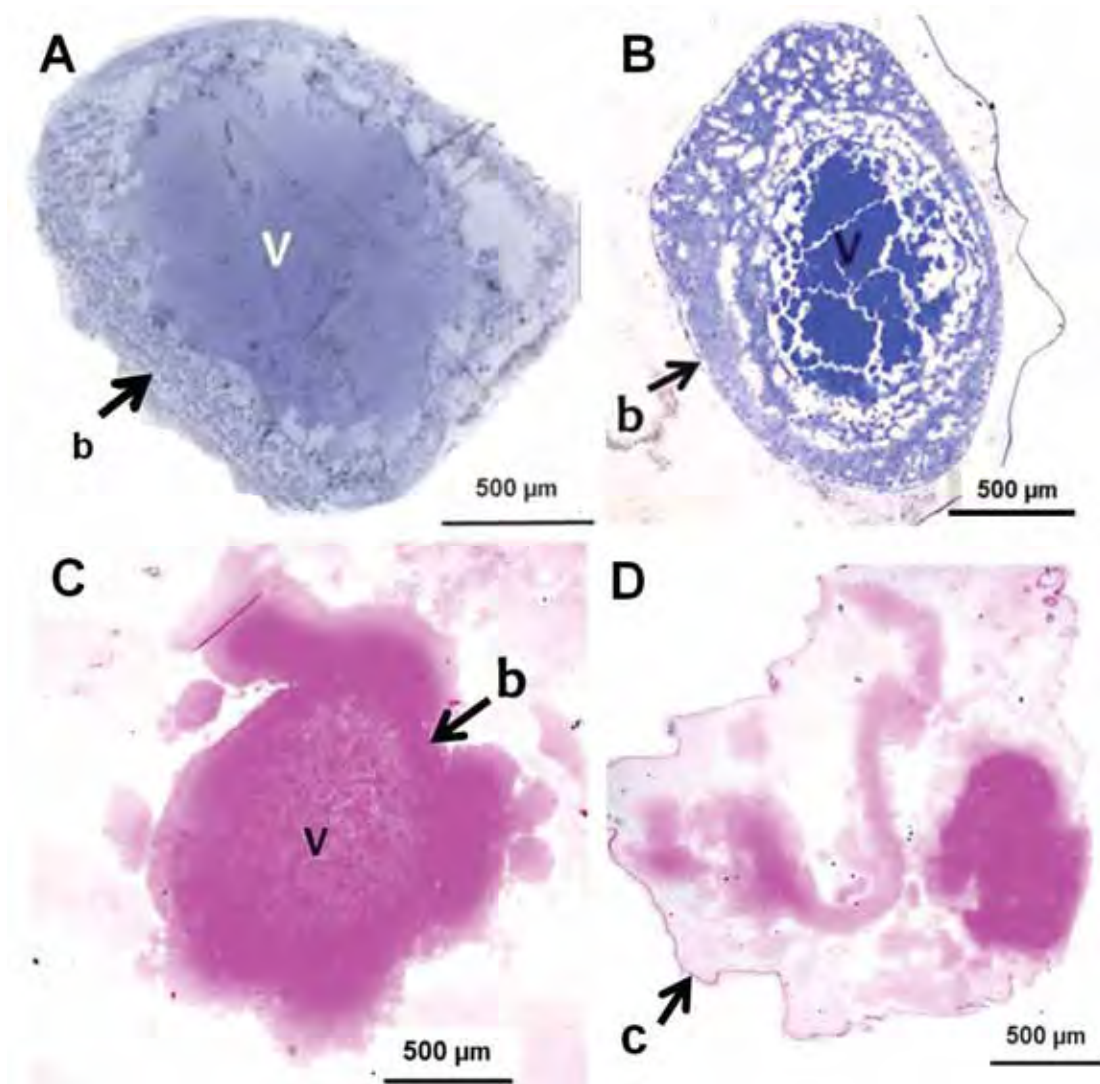


Figura 7. Fotomicrografias de ovos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*): submetidos ao resfriamento com células da blastoderme alteradas; vitelo apresentando aspecto alterado (tratamento 1, $0\pm 2^{\circ}\text{C}$, 10hrs); C e D – submetidos ao resfriamento com aspecto amorfo, blastoderme e vitelo indefinidos (A e C - tratamento 2, $0,0\pm 2,0^{\circ}\text{C}$, 10hrs; B e D - tratamento 3, $8,0\pm 2,0^{\circ}\text{C}$, 10hrs). (V - vitelo; b - blastoderme; c - córion) Coloração: A e B – Azul de Toluidina; C e D – Hematoxilina-Floxina.

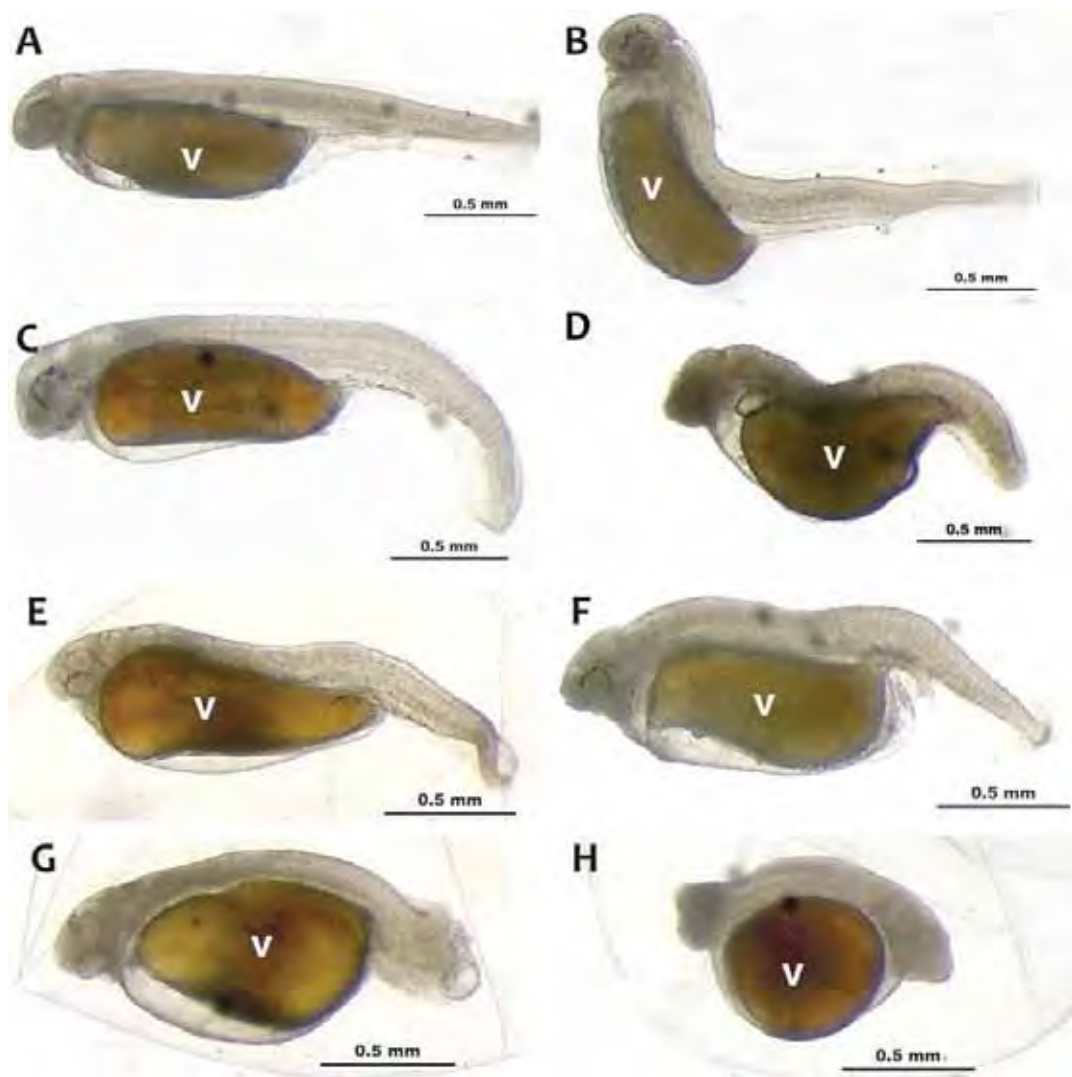


Figura 8. Estereomicrografias da morfologia externa das larvas de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*): A. desenvolvimento normal (controle positivo); B. deformidades na cauda que se desenvolveu para cima (tratamento 5; $0,0\pm 2,0^{\circ}\text{C}$; 6 hrs); C. deformidades na cauda que se desenvolveu para baixo (tratamento 5; $0,0\pm 2,0^{\circ}\text{C}$; 6 hrs); D. deformidades de vitelo, cabeça e cauda (tratamento 5; $0,0\pm 2,0^{\circ}\text{C}$; 6 hrs); E. microcefalia e deformidades na cauda e vitelo (tratamento 3; $0,0\pm 2,0^{\circ}\text{C}$; 6 hrs); F. cauda e vitelo apresentando anormalidades (tratamento 5; $0,0\pm 2,0^{\circ}\text{C}$; 6 hrs); G. deformidades de vitelo, cabeça e cauda (tratamento 1; $8,0\pm 2,0^{\circ}\text{C}$; 6 hrs); H. Larva pouco desenvolvida, com cauda e cabeça anormais (tratamento 5; $0,0\pm 2,0^{\circ}\text{C}$; 6 hrs) (V - vitelo).

Figura 9. Fotomicrografias de larvas de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*): A e B - com desenvolvimento normal (controle positivo); C, D, E e F - larvas submetidas ao resfriamento com vesícula óptica e prosencéfalo anormais (tratamento 5, $8,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$, 6 hrs; tratamento 3, $0,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$, 6 hrs; tratamento 5, $8,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$, 6 hrs; tratamento 2, $8,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$, 6 hrs, respectivamente). Coloração: A, C e E - Azul de Toluidina; B, D e F - Hematoxilina-Floxina.

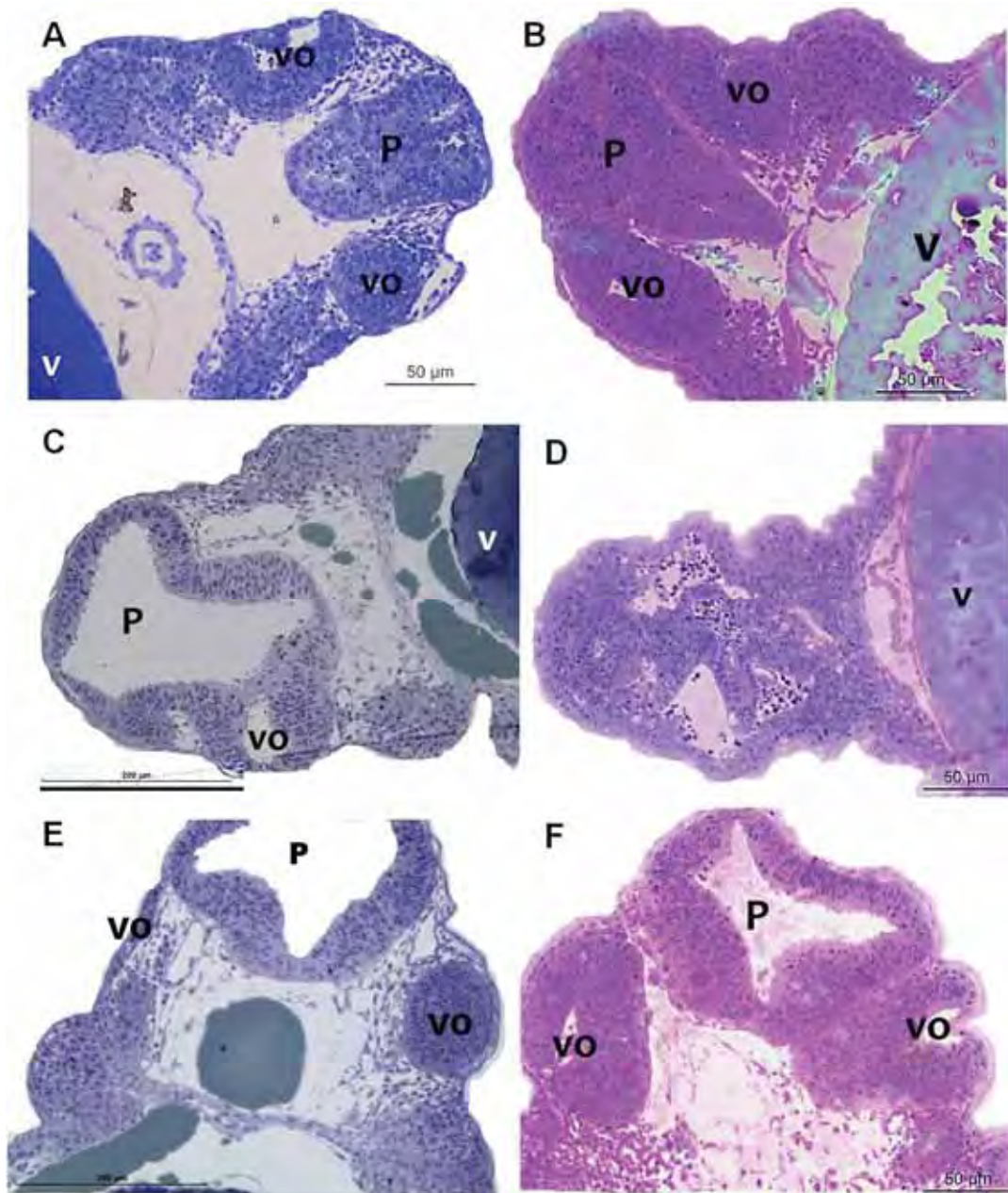
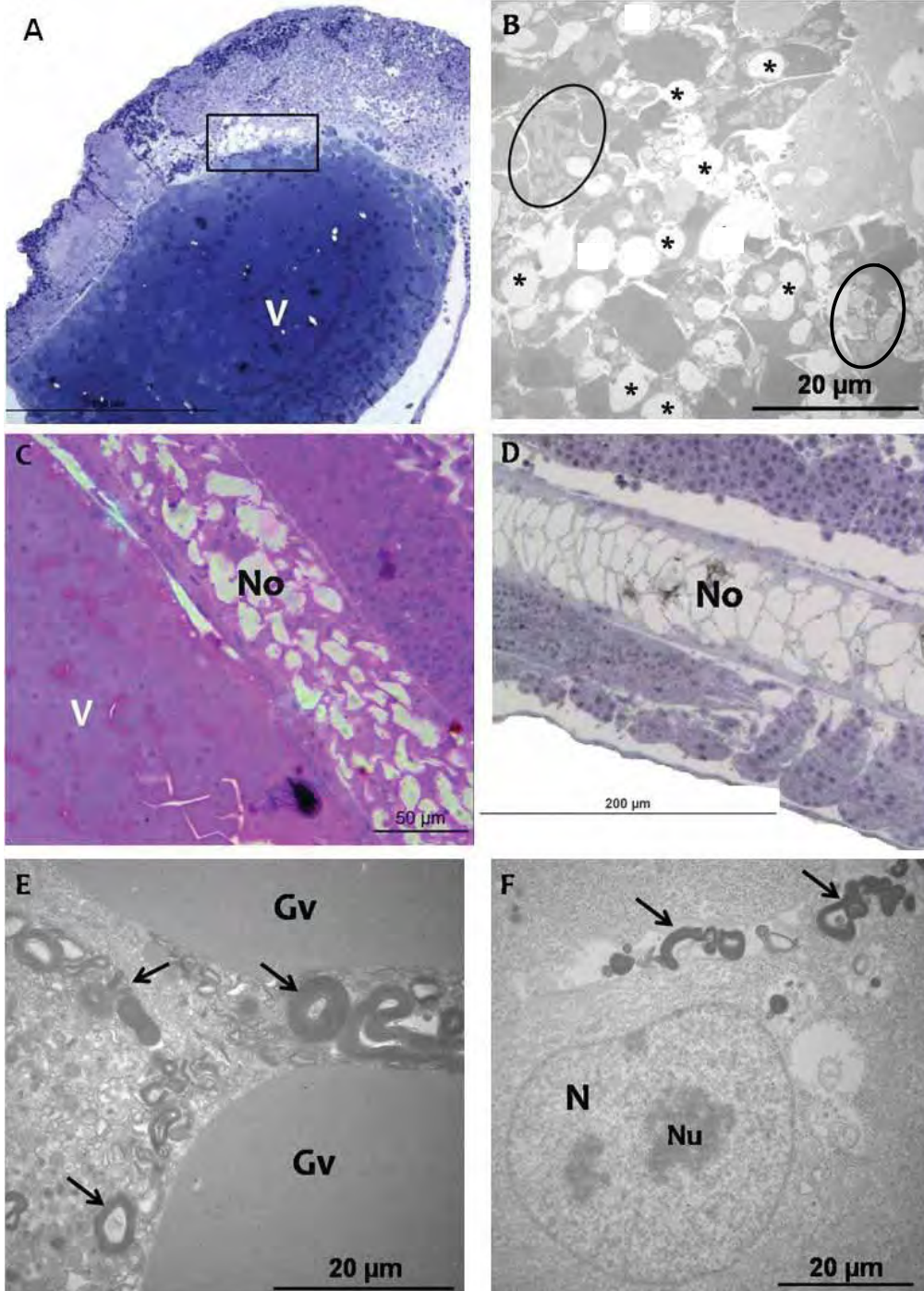


Figura 10: Fotomicrografias e eletronicografias de larvas de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*): A e B - larva submetida ao resfriamento apresentando vacúolos e mitocôndrias (tratamento 5, $0\pm 2^{\circ}\text{C}$, 10 hrs); C e D - larva submetida ao resfriamento mostrando notocorda com aspecto alterado (tratamento 1, $8\pm 2^{\circ}\text{C}$, 6 hrs) e larva do controle positivo, respectivamente; E e F - larvas submetidas ao resfriamento mostrando conteúdo desconhecido entre grânulos de vitelo e intra célula da cabeça (tratamento 7, $8\pm 2^{\circ}\text{C}$, 6 hrs). (Quadrado - região onde se encontra vacúolos; círculo - mitocôndrias; asterisco - vacúolos. No - notocorda; Gv - grânulos de vitelo; setas - conteúdo desconhecido de aspecto coloidal; N - núcleo; Nu - nucléolo). Coloração: A e D - Azul de Toluidina; C - Hematoxilina-Floxina.



6. DISCUSSÃO

O resfriamento tanto para gametas quanto para embriões de peixes, tem se tornado uma alternativa viável para conservação a curto prazo (ZANIBONI-FILHO e NUÑER, 2004). Para se atingir o sucesso neste procedimento muitos fatores devem ser estudados e considerados em conjunto, tais como: a espécie com que se vai trabalhar; o tipo, a toxicidade e concentração dos crioprotetores a serem utilizados; a fase do desenvolvimento embrionário que melhor resiste ao frio; a curva de resfriamento aplicada; a temperatura e o tempo de estocagem; o reaquecimento e rehidratação dos embriões após o resfriamento; e ainda, deve-se avaliar não só dados de eclosão e sobrevivência mas também os danos estruturais, ultraestruturais e genéticos causados pela baixa temperatura, para assegurar que estes embriões que sobreviveram terão condições de se tornarem indivíduos adultos.

Os protocolos de resfriamento variam muito de espécie para espécie. Analisando os trabalhos de Zhang et al. (1993) (*Danio rerio*); Ahammad et al. (1998) (*Labeo rohita*, *Catla catla*, *Cirrhinus mrigala*); Ahammad et al. (2002) (*Cyprinus carpio*); Beirão et al. (2006) (*Spaarus aurata*); Streit Jr. et al. (2007) (*Piaractus mesmopotamicus*); Fornari et al. (2011) (*Rhinolepis aspera*) notamos que um protocolo utilizado com sucesso em uma espécie pode não ser aplicado com os mesmos resultados satisfatórios à outra, isto porque cada uma possui suas particularidades.

Levando-se em conta que a piracanjuba é uma espécie sensível ao manejo reprodutivo, pois é comum a morte de matrizes após submissão à indução hormonal e desova (GANECO e NAKAGHI, 2003) e que esse estresse reprodutivo reflete na qualidade das desovas (ZANIBONI-FILHO e NUÑER, 2004), as taxas de sobrevivência pós-resfriamento encontradas nesta pesquisa podem ser consideradas razoáveis, embora novos protocolos de resfriamento deverão ser testados para resultados ainda melhores.

Além da sensibilidade da espécie, outros fatores podem influenciar a sobrevivência de larvas, tais como a qualidade da água de incubação e herança genética das matrizes (SAILLANT et al., 2001), assim, para minimizar possíveis problemas genéticos, foi utilizado um "pool" de desovas provenientes de vários reprodutores e os embriões utilizados nos experimento foram previamente selecionados para assegurar que eram viáveis. Os valores de temperatura e oxigênio dissolvido na água das incubadoras experimentais também foram constantemente monitorados, estando os resultados dentro da faixa considerada aceitável para o cultivo da piracanjuba, de acordo com Reynalte-Tataje et al. (2004).

Como observado, qualquer que seja o protocolo utilizado, é imprescindível a utilização de soluções crioprotetoras (FORNARI et al., 2011). Os crioprotetores mais comumente usados para peixes são metanol, DMSO, glicerol, etilenoglicol e sacarose (ZHANG et al., 1993). O etilenoglicol é o crioprotetor mais utilizado em protocolos de criopreservação nas espécies domésticas, devido ao seu baixo peso molecular e baixa toxicidade (GREEN, 2005). Porém, segundo Dobrinsky (2002), a estratégia para o sucesso dos protocolos de criopreservação está na combinação de crioprotetores intracelulares e extracelulares que vem sendo usados e aprimorados para a obtenção de resultados cada vez melhores.

A realização de testes de toxicidade são importantes para avaliar se o comprometimento da sobrevivência e deformidade de embriões ocorrem devido ao crioprotetor ou à baixa temperatura. A tolerância ao crioprotetor varia de acordo com a concentração utilizada. Em altas concentrações, os crioprotetores podem causar injúrias celulares devido a sua toxicidade química e ao estresse osmótico (PAPADOPOULOS et al., 2002), causando desnaturação de proteínas, desarranjo da bicamada lipídica e deteriorização de toda estrutura celular (GODOY, 2012).

Silva et al. (2006) avaliaram a toxicidade do DMSO em *Brycon orbignyanus* em diferentes concentrações e concluíram que este quando usado na concentração de 2M não foi tóxico aos embriões, porém nas concentrações de 4M, 6M e 8M, já se observaram algum tipo de dano. Zhang et al. (1993) verificaram que a máxima concentração não tóxica para embriões de *Danio rerio* expostos por 30 minutos, à temperatura ambiente, em diferentes fases de desenvolvimento embrionário, foram de 2M para metanol, DMSO e etilenoglicol, 1M para glicerol e 0,5M para sacarose. Os embriões de piracanjuba, nas condições experimentais desta pesquisa, apresentaram boa tolerância às concentrações e crioprotetores utilizados, mostrando que a toxicidade dos crioprotetores varia para cada espécie.

A sensibilidade ao frio também está diretamente ligada à fase de desenvolvimento embrionário (ZHANG e RAWSON, 1995; LOPES et al., 2012). Os estágios ontogenéticos iniciais são mais sensíveis à exposição de crioprotetor do que estágios mais avançados (LAHNSTEINER, 2008). Lahnsteiner (2008) sugere que o início dos processos de diferenciação celular podem ser afetados pelos crioprotetores e que, pouco depois da fertilização, os processos que conduzem à proteção contra o ambiente ainda não estão completamente terminados (endurecimento do córion, absorção de água e osmorregulação) e, portanto, estágios ontogenéticos iniciais podem ser altamente permeáveis a agentes

crioprotetores. Além disso, o potencial de desintoxicação das vias metabólicas reguladoras de embriões em fase inicial, são menos capazes de compensar efeitos tóxicos quando comparados aos estágios mais avançados.

Em contrapartida, quando o embrião está em estágio muito avançado, este também apresenta particularidades que não são recomendáveis à criopreservação, tais como uma maior complexidade de células. Em embriões de *Piaractus mesopotamicus* submetidos ao resfriamento, em 4 estágios de desenvolvimento diferentes, verificou que o estágio de fechamento do blastóporo foi o que apresentou maiores índices de sobrevivência (LOPES, 2010). Este estágio foi o escolhido para o presente estudo baseado nos bons resultados apresentados nos trabalhos de resfriamento com espécies tropicais, tais como pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (STREIT JR. et al., 2007; NEVES, 2008; DIGMAYER, 2010; FORNARI et al., 2010) e cascudo preto (*Rhinelepis aspera*) (FORNARI et al., 2011).

Outro fator importante num protocolo de resfriamento é a curva de resfriamento que nada mais é do que a velocidade de redução da temperatura concomitantemente com a desidratação que as células sofrem enquanto estão sendo resfriadas (LOPES, 2010). No presente estudo, os embriões foram resfriados da temperatura ambiente para 20,0°C por 10 minutos, depois para 10,0°C por mais 10 minutos e então estocados a 8,0±2,0°C ou 0,0±2,0°C.

Quando o resfriamento é lento o suficiente as células são capazes de perder água rapidamente por osmose, e assim suportar a desidratação (LOPES, 2010). Por outro lado, se o resfriamento for rápido demais, o potencial químico da água e da solução extracelular diminui mais rápido do que o da água intracelular, resultando em água intracelular remanescente que pode formar gelo intracelular letal para as células (ZHANG et al., 2007).

Zhang et al. (2003) demonstraram que, em embriões de *Danio rerio* submetidos a diferentes curvas de resfriamento (10,0°C/minuto, 30,0°C/minuto, ~300,0°C/minuto), o efeito do crioprotetor metanol apresentou resultados mais satisfatórios quando os embriões foram submetidos ao resfriamento mais lento, não apresentando diferenças significativas em relação ao controle não resfriado.

Deve-se levar em consideração também a temperatura e o tempo de estocagem que os embriões podem suportar sem comprometer sua sobrevivência. Ahammad et al. (1998) testando diferentes concentrações de crioprotetores para três espécies de carpa, expostos à temperatura de 4,0°C e utilizando como crioprotetores metanol e sacarose, relataram sobrevivência máxima de, aproximadamente, 57,5% para *Labeo rohita*, com 13 horas de estocagem; 47,5% para *Catla catla*, com 8 horas de estocagem e, 32,5% para *Cirrhinus*

mrigala, com 12 horas de estocagem. Um estudo com cascudo preto (*Rhinelepis aspera*), apresentou dados de aproximadamente 50% de sobrevivência, utilizando-se soluções crioprotetoras em que o metanol e a sacarose estavam presentes, por 6 horas a uma temperatura de $-8,0^{\circ}\text{C}$ (FORNARI et al., 2011). Trabalhos com o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) apresentaram taxas de sobrevivência de 69%, 85% e 40,5%, quando estocados por 6 horas à temperaturas de $-8,0^{\circ}\text{C}$ na combinação dos crioprotetores metanol + sacarose, em diferentes concentrações (STREIT JR et al., 2007; FORNARI, 2009; DIGMAYER, 2010). Para a piracanjuba, quando se aumentou o tempo de estocagem de 6 para 10 horas, bem como, quando diminuiu-se a temperatura de $8,0\pm 2,0^{\circ}\text{C}$ para $0,0\pm 2,0$, os valores médios de eclosão e sobrevivência caíram quase pela metade e os embriões não sobreviveram com 24, 72 e 168 horas de estocagem, corroborando os estudos de Ahammad et al. (2003) que estudando carpa comum (*Cyprinus carpio*) afirmaram que a taxa de sobrevivência tende a diminuir conforme se aumenta o período de armazenamento.

O posterior reaquecimento e rehidratação dos embriões também é importante e deve ser considerado em processos de resfriamento. Há protocolos que utilizam o reaquecimento lento, expondo, por exemplo, os embriões ao ar em temperatura ambiente, ou reaquecimento rápido, através da imersão em banho-maria por alguns minutos à uma temperatura entre $28,0$ e $30,0^{\circ}\text{C}$, ou ainda campos com frequência eletromagnética (forno de micro-ondas especial), por vezes considerado inadequado por promover o aquecimento da amostra de forma desigual (ROBINSON et al., 2002).

Desai et al. (2011) estudando embriões de *Danio rerio*, em diferentes fases do desenvolvimento, quando submetidos ao resfriamento e posterior reaquecimento em banho-maria a $28,0^{\circ}\text{C}$, não notaram diferenças significativas nas taxas de eclosão. No presente estudo, para que o choque térmico não fosse muito grande, os embriões de piracanjuba foram aclimatados por 15 minutos em banho-maria com água da incubadora à temperatura ambiente, para posterior remoção dos crioprotetores e incubação.

A remoção do crioprotetor é necessária para que ocorra a rehidratação dos embriões e diminua danos causados pela sua toxicidade (GREEN, 2005). De acordo com Schneider e Mazur (1984) citado por Godoy (2012), a diluição do crioprotetor tem como função evitar a entrada muito rápida de água na célula, pois uma redução drástica na osmolaridade levaria a lise celular. Wessel e Ball, (2004) recomendam uma diluição gradual da solução crioprotetora durante a remoção a fim de amenizar efeitos deletérios.

Vários fatores podem ocasionar deformidades em embriões, dentre eles, Leme dos Santos e Azoubel (1996) que afirmaram que a temperatura da água de incubação influencia

diretamente o desenvolvimento embrionário dos peixes sendo que em temperaturas mais baixas esse tempo é maior e em temperaturas mais altas o desenvolvimento é acelerado podendo inclusive acarretar deformidades. Este fato foi observado em *B. orbignyanus*, que apresentou larvas deformadas não só nos tratamentos de resfriamentos testados como também uma pequena porcentagem de larvas deformadas foram encontradas no grupo controle quando a temperatura superou os 30,0°C.

Digmayer (2010) encontrou larvas defeituosas para pacus quando submetidos ao resfriamento. Este dado é importante ser relatado, pois, embora vivas e com batimento cardíaco, larvas deformadas dificilmente terão condições de se desenvolverem até a fase adulta.

Neves (2008) descreveu para embriões de pacu submetidos ao congelamento e descongelamento que estes se apresentavam com uma coloração esbranquiçada e córion rompido quando visualizados em microscopia de luz. Também foi encontrado para os embriões de piracanjuba o aspecto opaco e esbranquiçado logo após o resfriamento, porém, quando visualizados em microscopia de luz, pode-se observar que o córion destes embriões permaneceu intacto.

Hagedorn et al. (1998) estudando danos ultraestruturais causados pelo congelamento em embriões de zebrafish expostos aos crioprotetores DMSO e propilenoglicol, relataram que o vitelo manteve-se íntegro morfológicamente, com membranas intactas e conteúdo aparentemente normal. Porém, nas condições experimentais desta pesquisa, embriões de piracanjuba apresentaram vitelo alterado e com o conteúdo dos grânulos extravasado ou grânulos em formato irregular, o que também pôde ser visualizado em microscopia eletrônica de transmissão. Neves (2008) considera que a lesão das membranas celulares dos grânulos de vitelo possa ocorrer por vários fatores, tais como, a baixa temperatura, penetração insuficiente de crioprotetores, tempo insuficiente de permeação ou toxicidade da solução crioprotetora utilizada.

Na maioria dos ovos analisados a blastoderme e a camada sincicial de vitelo se mostraram totalmente danificadas, não sendo possível distinguir as células claramente. Neves et al. (2012) também encontraram em embriões de pacu pós-descongelamento, a camada sincicial vitelina em formato, tamanho e espessura variadas com localização atípica, sendo muitas vezes encontrada abaixo do vitelo, ou envolvendo pedaços deste separados. Dobrinsky (1996) afirma que a formação de cristais de gelo intracelular pode lesar a membrana plasmática da célula, desnaturar as funções intracelulares e as organelas.

7. CONCLUSÕES

Diante dos protocolos testados, verificou-se que a temperatura e o tempo de estocagem são fatores críticos para os embriões, pois, nos tempos de 24, 72 e 168 horas não houve sobrevivência e em todos os tratamentos testados houve larvas apresentando anomalias. Quando se alterou o tempo de estocagem de 6 para 10 horas, bem como a temperatura de $8,0\pm 2,0^{\circ}\text{C}$ para $0,0\pm 2,0^{\circ}\text{C}$, a mortalidade dos embriões aumentou significativamente. A interação entre todas as variáveis testadas não apresentou diferença significativa, mas quando considerou-se as médias dos tratamentos, independente da temperatura e do tempo de estocagem, aquele que apresentou melhor índice de sobrevivência foi o que utilizou a combinação de Sacarose + Metanol + DMSO.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ainda há muito o que se conhecer e estudar quando se trata de criopreservação de embriões de peixe, não somente *B. orbignyanus*, mas também de muitas espécies de teleósteos que se encontram ameaçadas de extinção e necessitam de medidas conservacionistas urgentes.

Esta pesquisa, de extrema importância, fornece valiosas informações a respeito do comportamento de embriões perante o resfriamento e contribuirá não só para reprodução, repovoamento e conservação desta espécie, como também irá servir de base para novas pesquisas afim de se obter respostas ainda melhores e num futuro não muito distante, possibilitar o restabelecimento da população da piracanjuba em nossos rios.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHAMMAD, M. M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B. B. Effect of Different Concentrations of cryoprotectant and extender on the hatching of Indian Major carp embryos (*Labeo rohita*, *Catla catla*, and *Cirrhinus mrigala*) stored at low temperature. **Cryobiology**, v.37, p.318-324, 1998.

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

AHAMMAD, M. M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B. B. Hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos stored at 4 and -2°C in different concentrations of methanol and sucrose. **Theriogenology**, v.60, n.8, p.1409-1422, 2003.

ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.2, p.166-172, 2003.

ANDRADE-TALMELLI, E. F.; KAVAMOTO, E. T.; ROMAGOSA, E. et al. Embryonic and larval development of the “piabanha”, *Brycon insignis* Steindachner, 1876 (Pisces, Characidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 21-27. 2001.

BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Ed. da UFSM, Santa Maria, 2005. 468p.

BART, A. New approaches in cryopreservation of fish embryos. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. Cryopreservation in aquatic species. Batou Rouge: **World Aquaculture Society**, p. 179-187, 2000.

BEIRÃO, J.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, M. P. et al. Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. **Aquaculture**, v. 261, p.897–903, 2006.

BOTERO, M.; FRESNEDA, A.; MONTOYA, A. F. et al. Descripción del desarrollo embrionario de zigotos híbridos obtenidos por el cruce de machos de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*) y hembras de Cachama Negra (*Colossoma macropomum*). **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellín, v. 17, p. 38-45. 2004.

CABRITA, E.; ROBLES, V.; CHEREGUINI, P. P. et al. Dimethyl sulfoxide influx in turbot embryos exposed to a vitrification protocol. **Theriogenology**, v. 60, p. 463-473, 2003.

CAROSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C. et al. **Migratory Fishes of South America - Biology Fisheries and Conservation Status**. Ed. World Fisheries Trust, Victoria, Canada, 2003, 372 p.

CASTAGNOLLI, N. **Criação de peixes de água doce**. FUNEP, Jaboticabal, 1992. 189p.

CONTE, L.; BOZANO, G.L.N.; FERRAZ DE LIMA, J.A. Influência do sistema de alimentação no crescimento da piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, em gaiolas. **Boletim Técnico do CEPTA**, v.8, p.49-59, 1995.

DENNISTON, R.; MICHELET, S.; GODKE, R.A. Principles of cryopreservation. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. Cryopreservation in aquatic species. **World Aquaculture Society**. 2000, p.59-74.

DESAI, K.; SPIKINGS, E.; ZHANG, T. Effect of chilling on sox2, sox3 and sox19a gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Cryobiology**, v.2, p.96-103,2011.

DIGMAYER, M. **Viabilidade de embriões de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (holmberg, 1887), submetidos a -8°C e, diferentes concentrações de crioprotetores**. 2010, 65p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá – Área de concentração Produção Animal - UEM: Maringá: 2010.

DOBRINSKY, J.R. Cellular approach to cryopreservation of embryos. **Theriogenology**, v.45, p.17-26, 1996.

DOBRINSKY, J.R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. **Theriogenology**, v.57, p.285-302, 2002.

FAUSTINO, F.; NAKAGHI, L. S. O.; MARQUES, C. et al. Fertilização e desenvolvimento embrionário: morfometria e análise estereomicroscópica dos ovos dos híbridos de surubins (pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* X cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 29, p. 49-55. 2007.

FAUSTINO, F.; NAKAGHI, L. S. O.; NEUMANN, E. *Brycon gouldingi* (Teleostei, Characidae): aspects of the embryonic development in a new fish species with aquaculture potential. **Zygote**, v. 19, p. 351-363, 2010.

FLORES, J.C.B.; ARAIZA, M.A.F.; VALLE, M.R.G. **Desarrollo embrionario de *Ctenopharyngodon indellus* (Carpa herbívora)**. CIVA 2002 (<http://www.civa2002.org>), p.792-797, 2002.

FORNARI, D. C. **Crioprotetores no resfriamento e congelação de embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2009, 64p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá – Área de concentração Produção Animal - UEM: Maringá: 2009.

FORNARI, D. C.; RIBEIRO, R. P.; STREIT JR., D. P. et al. Freezing injuries in the embryos of *Piaractus mesopotamicus*. **Zygote**, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/S0967199410000432>>, acesso em 29 de janeiro de 2013.

FORNARI, D. C.; RIBEIRO, R. P.; STREIT JR., D. et al. Effect of cryoprotectants on the survival of cascudo preto (*Rhinelepis aspera*) embryos stored at -8°C . **Zygote**, v. 1, p.1-6, 2011.

FREIRE-BRASIL, D. **Análise estrutural e ultraestrutural da maturação final do ovócito, fertilização e primeira clivagem em curimbatá, *Prochilodus lineatus Valenciennes, 1836***. 2001, 36p. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura - Universidade Estadual Paulista - UNESP: Jaboticabal, 2001.

GANECO, L. N. **Análise dos ovos de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849), durante o desenvolvimento embrionário, sob condições de reprodução induzida.** 2003. 66 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista - UNESP: Jaboticabal, 2003.

GANECO, L. N.; NAKAGHI, L. S. O. Morfologia da micrópila e da superfície dos ovócitos de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Osteichthyes, Characidae), sob microscopia eletrônica de varredura. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v. 25, n.1, p.227-231, 2003.

GANECO, L. N.; FRANCESCHINI-VICENTINI, I. B.; NAKAGHI, L. S. O. Structural analysis of fertilization in the fish *Brycon orbignyanus*. **Zygote**, v. 17, p. 93–99, 2008.

GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 351 – 360, 2007.

GODOY, L. C. **Desenvolvimento de protocolo para criopreservação de folículos ovarianos em peixes usando vitrificação.** 2012. 114p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Programa de pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - FURG: Porto Alegre, 2012.

GOULDING, M. **The fishes and the forest. Explorations in Amazonian Natural History.** University of California Press. Berkeley, USA. 1980, 280p.

GREEN, R. E. **Princípios e técnicas da vitrificação de embriões dos animais domésticos.** 2005. 21 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista - UNESP: Botucatu, 2005.

GURAYA, S. S. Recent advances in the functional morphology of follicular wall, egg-surface components, and micropyle in the fish ovary. In: DATTA MUNSHI, J. S.; DUTTA, H. M. (eds) **Fish Morphology.** Horizon of new research. Brookfield: A. A. Balkema Publishers, p. 111-145, 1996.

HAGEDORN, M.; KLEINHANS, F.W.; ARTEMOV, D. et al. Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo. **Biology Reproduction**, v.59, p.1240–1250, 1998.

HARVEY, B.; CAROSFELD, J. **Induced breeding in tropical fish culture**. Ottawa: IDRC. 1993. 145p.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p. 3-22, 2000.

HOWES, G. Review of the genus *Brycon* (Teleostei, Characoidei). Bulletin of the British Museum Natural History (**Zoology**), v. 43, n. 1, p. 1-47. 1982.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis In: **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção** / Eds. Angelo Barbosa Monteiro Machado, Gláucia Moreira Drummond, Adriano Pereira Paglia. - 1.ed. - Brasília, DF : MMA; Belo Horizonte, MG : Fundação Biodiversitas, 2008. v.2, 1420 p.

KIMMEL, C. B.; BALLARD, W. W.; KIMMEL, S. R. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**. v. 203, p. 253-310, 1995.

LAHNSTEINER, F. The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, v.69, p.384-396, 2008.

LEME DOS SANTOS, H. S. e AZOUBEL, R. **Embriologia comparada**. FUNEP, Jaboticabal, 1996, 189p.

LIMA, F. C. T.; CASTRO, R. M. C. *Brycon vermelha*, a new species of characid fish from the Rio Mucuri, a coastal river of eastern Brazil (Ostariophysi: Characiformes). **Ichthyological Exploration in Freshwater**, v. 11, p. 155-162. 2000.

LOPES, T. S. **Resfriamento de embriões de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (holmberg, 1887) em diferentes fases do desenvolvimento ontogenético**. 2010, 65 p. Dissertação

(Mestrado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura - Universidade Estadual Paulista - UNESP: Jaboticabal, 2010.

LOPES, T. S.; STREIT JR., D. P.; FORNARI, D. C.; et al. Chilling curves for *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) embryos stored at -8°C. **Zygote**, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/S0967199412000020>>, acesso em 29 de janeiro de 2013.

MACIEL, C. M. R. R. **Ontogenia de larvas de piracanjuba, *Brycon orbignyanus Valenciennes (1849)* (Charciformes, Characidae, Bryconinae)**. 2006. 229 p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa: Viçosa, 2006.

MARQUES, C. **Desenvolvimento embrionário do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*)**. 2005. 70 p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista - UNESP: Jaboticabal, 2005.

MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; VIVEIROS, A. T. M. et al. Resfriamento do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) a 4°C, utilizando diferentes concentrações de dimetilsulfóxido. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 209-211, 2002.

MURGAS, L. D. S.; FRANCISCATTO, R. T.; SANTOS, A. G. O. Avaliação Espermática Pós-Descongelamento em Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n.6, p. 1810-1814. 2003.

MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FRANCISCATTO, R. T. et al. Viabilidade Espermática do Sêmen de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) Resfriado a 4°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n.6, p. 1361-1365. 2004.

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Nupélia, Maringá, 2001, 359p.

NEUMANN, E. **Desenvolvimento inicial da jatuarana, *Brycon amazonicus* (Teleostei, Characidae)**. 2008. 125p. Tese (Doutorado em Aqüicultura). Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista – UNESP: Jaboticabal. 2008.

NEVES, P. R. **Utilização de crioprotetores intra e extracelulares em embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2008. 71p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Programa de Pós-Graduação em Zootec da Universidade Estadual de Maringá - Área de concentração Produção Animal: Maringá – 2008.

NEVES, P. R.; RIBEIRO, R. P.; STREIT JR., D. P. et al. Injuries in pacu embryos (*Piaractus mesopotamicus*) after freezing and thawing. **Zygote**, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/S096719941200024X>>. Acesso em 29 de janeiro de 2012.

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, v.35, p.109-124, 1991.

NINHAUS-SILVEIRA, A. Preservação dos gametas de peixes e suas aplicações. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**, v.20, n.4, p.516-517. 2004.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes; Prochilodontidae). **Zygote**, v. 14, p. 217-229, 2006.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A. et al. Cryogenic preservation of embryos of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote**, v. 17, p. 45-55. 2008.

PAES, M. C. F. **Indução à reprodução e desenvolvimento embrionário e larval do ciclídeo acará-açu *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831)**. 2008, 68p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista - UNESP: Jaboticabal, 2008.

PANARARI-ANTUNES, R. S.; PRIOLI, A. J.; PRIOLI, S. M. A. P. et al. Genetic Variability of *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (Characiformes: Characidae) in

Cultivated and Natural Populations of the Upper Paraná River, and Implications for the Conservation of the Species. **Brazilian Archives of Biology and Technology Aninternational Journal**, v.54, n. 4: pp. 839-848, 2011.

PAPADOPOULOS, S.; RIZOS, D.; DUFFY, P. et al. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro produced ovine blastocysts. **Animal Reproduction Science**, v.74, p. 35-44, 2002.

RALL, W.F. Recent advances in the cryopreservation of salmonid fishes. In: **Genetic Conservation of Salmonid Fishes** (J.G. Cloud e G.H. Thorgaard, eds.), Plenum, New York pp. 137–58, 1993.

RANG, H. P.; DALE, M.M.; RITTER, J. M. et al. **Farmacologia** 5th ed. Rio de Janeiro, ed Elsevier, 2005.

RAWSON, D.; ZHANG, T. New approaches to the cryopreservation of fish oocytes and embryos. **The role of biotechnology** - Villa Gualino, Turin, Italy – 5-7 March, p.209 -210, 2005.

REICHENBACH, H. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F. et al. **Transferência e criopreservação de embriões bovinos**. In: GONÇALVES, P. B. D., FIGUEREDO, J. R., FREITAS, V. J. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo, Livraria Varela, p. 77-127, 2008.

REYNALTE-TATAJE, D.; ZANIBONI-FILHO, E.; ESQUIVEL, J. R. Embryonic and larvae development of piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 (Pisces, Characidae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 26, no. 1, p. 67-71, 2004.

RIEHL, R. Micropyle of some salmonids and coregonids. **Environment Biology of Fish**, v.5, p.59-66, 1980.

RIZZO, E.; GODINHO, H. P. Superfície de ovos de peixes Characiformes e Siluriformes, p. 112 - 130. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (Ed.) **Águas, peixes e pescadores do**

São Francisco das Minas Gerais, Belo Horizonte: CNPq/PADCT, Editora PUC Minas, 2003, 468 p.

ROBLES, V.; CABRITA, E.; HERRÁEZ, M.P. Germplasm cryobanking in zebrafish and other aquarium model species. **Fish Haus**, v.6, n3, p.281-293, 2009.

ROBINSON, M. P.; WUSTEMAN, M. C., WANG, L. Electromagnetic re-warming of cryopreserved tissues: Effect of choice of cryoprotectant and sample shape on uniformity of heating. **Physics in medicine and biology**. v. 47, p. 2311-2325, 2002.

ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M. Y.; FENERICH-VERANI, N. Stages of embryonic development of the “matrinxã”, *Brycon cephalus* (Pisces, Characidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 29-32. 2001.

ROMAGOSA, E. Reprodução induzida em peixes tropicais. In.: Congresso de Integração em Biologia da Reprodução. **Resumos abstracts**. p.59, 2003.

SAILLANT, E.; CHATAIN, B.; FOSTIER, A. et al. Parental influence on early development in the European sea bass. **Journal of Fish Biology**, v.58, p.1585–1600, 2001.

SAMPAIO, K. H. **Superfície ovocitária e desenvolvimento inicial de quatro espécies de peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco**. 2006. 53 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais: Belo Horizonte, 2006.

SANSONE, G., NASCIMENTO, I. A., LEITE, M. B. N. L., et al. Toxic effects of cryoprotectants on oyster gametes and embryos: a preliminary step towards establishing cryopreservation protocols. **Biociências**, Porto Alegre, v. 13, n. 1, p. 11-18, 2005.

SANTIN, T. R., BLUME, H., MONDADORI, R. G., Criopreservação de embriões – metodologias de vitrificação. **Veterinária e Zootecnia**, p. 561-574, v.16, n.4, 2009.

SATO, Y. **Reprodução de peixes da bacia do rio São Francisco: indução e caracterização de padrões**. 1999. 198 p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos

Naturais), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal São Carlos, São Carlos, 1999.

SILVA, J. M. A.; MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. et al. Toxidez de soluções crioprotetoras antes do congelamento de embriões de piracanjuba (*Brycon orbygnianus*). In: Congresso Aquacultura/Aquabio, 2006, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: (CD-ROM) 2006.

STREIT Jr., D. P.; DIGMAYER, M.; RIBEIRO, R. P. et al. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.8, p.1199-1202, 2007.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS-NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. Manole, Barueri, 2003. 341p.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.357-364, 2000.

VAZ, M. M., TORQUATO, V. C., BARBOSA, N. D. C. **Guia ilustrado de peixes da Bacia do Rio Grande**. CEMIG/CETEC, Belo Horizonte, 2000. 144p.

WESSEL, M. T.; e BALL, B. A. Step-wise dilution for removal of glycerol from fresh and cryopreserved equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.84, p.147-156, 2004.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão**. FAO/CODEVASF/CNPq, Brasília, 1983. 225p.

ZANIBONI-FILHO, E. **Projeto de extensão: programa de monitoramento e manejo da ictiofauna do alto rio Uruguai. 2- desvio do rio e enchimento**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina / Departamento de Aqüicultura, 1999.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A. P. O. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In.: **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. P. 45-73, São Paulo: TecArt, 2004.

ZHANG, T.; RAWSON, D. M.; MORRIS, G. J. Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Aquatic Living Resources**, v.6, p.145-153, 1993.

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

ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology**, v.33, p.1-13, 1996.

ZHANG, T.; LIU, X.; RAWSON, D. M. Effects of methanol and developmental arrest on chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, v.59, p.1545-1556, 2003.

ZHANG, T.; RAWSON, D. M.; PEKARSKY, I.; BLAIS, I.; LUBZENS, E. Low temperature preservation of fish gonad cells and oocytes. In: BADIN, P. J.; CERDÀ, J. e LUBZENS, E. **The fish oocytes: from basic studies to biotechnological applications**, Springer, 2007. p.411-436.