

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**CRIOCONSERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE TAMBAQUI**  
*(Colossoma macropomum)*

Autor: Darci Carlos Fornari  
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro  
Coorientador: Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Jr.

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Junho – 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**CRIOCONSERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE TAMBAQUI**  
*(Colossoma macropomum)*

Autor: Darci Carlos Fornari  
Orientador: Prof Dr. Ricardo Pereira Ribeiro  
Coorientador: Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Jr.

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de Concentração Produção Animal.

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Junho – 2012

## CIP – CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

639.3.05:60

F727c Fornari, Darci Carlos.

Crioconservação de embriões de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) /  
Darci Carlos Fornari. -- Maringá, 2012.

iv, 77 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências  
Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de  
Concentração Produção Animal - PPZ, 2012.

1. Biotecnologia. 2. Embriões, Reprodução e Conservação. 3. Criopreservação.  
4. Tambaqui, Crioconservação. 5. Material Genético, Preservação.  
6. Zootecnia – Tese. I. Ribeiro, R. P., Dr. II. Streit Jr., D. P., Dr. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo bibliotecário Luiz Kenji Umeno Alencar - CRB1  
2037.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**CRIOCONSERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE  
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)**

Autor: Darci Carlos Fornari  
Orientador Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

TITULAÇÃO: Doutor em Zootecnia - Área de Concentração Produção  
Animal

APROVADA em 08 de junho de 2012.

Prof. Dr. Carlos Antonio  
Lopes de Oliveira

Prof. Dr. Luiz Paulo Rigolon

Prof. Dr. Jayme Aparecido Povh

Drª Emiko Kawakami de Resende

Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro  
(Orientador)

"Como é de são efeito, ajudo com meu querer acreditar. Mas nem sempre posso. O senhor saiba: eu toda a minha vida pensei por mim, fôrro, sou nascido diferente. Eu sou é eu mesmo. Divêrjo de todo o mundo... Eu quase que nada não sei. Mas desconfio de muita coisa. O senhor concedendo, eu digo: para pensar longe, sou cão mestre – o senhor solte em minha frente uma idéia ligeira, e eu rastreio essa por fundo de todos os matos, amém!"

João Guimarães Rosa

Grande Sertão: Veredas

Aos

meus pais, Dalci e Ibraina,  
minha eterna gratidão, admiração e  
respeito pelo exemplo de dedicação, simplicidade,  
carinho e amor aos valores da vida

Aos

meus irmãos, Anderson, Alione e Nereide  
pelo incentivo, carinho, amizade,  
companheirismo e pelos lindos  
sobrinhos que colocaram em minha vida  
Isabele, Ane Caroline, Kauan e Pedro

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por permitir que aqui chegasse, guiando-me em vários momentos difíceis no decorrer desta tese.

Aos meus Pais, **Dalci Fornari e Ibraina Fornari**, por estarem sempre ao meu lado, apoiando e mostrando os melhores caminhos a serem seguidos, nunca medindo esforços para meu sucesso pessoal.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. **Ricardo Pereira Ribeiro**, por depositar confiança no meu trabalho, pela orientação segura, atenção constante e amizade. Uma pessoa admirável, exemplo de caráter e honestidade.

Ao meu coorientador e amigo Prof. Dr. **Danilo Pedro Streit Jr**, pela coorientação e por todos os ensinamentos, exemplo de competência e dedicação que foram fundamentais ao sucesso deste trabalho.

Ao **João Pedro da Silva**, entusiasta da piscicultura, exemplo que faz a diferença para que tudo aconteça, obrigado por permitir fazer parte da tua equipe.

Aos Amigos Professores e pesquisadores; **Emiko, Juliana Galvão, Jayme Povh, Nelson Lopera-Barrero, Luiz Alexandre, Lauro Vargas, Carlos de Oliveira, Aparício Streit, Patrícia Neves, Robie Bombardelli e Fabio Meurer**, pelos ensinamentos, companheirismo e momentos que marcaram pelos diversos bate-papos.

As Zootecnistas **Laura Bota Tonissi e Carolina**, pelo auxílio nas correções e apoio na reta final da Tese.

Aos amigos do curso, **Juliana Minardi Galo, Débora Sommer Marques, Danniely Veloso Blank, Melanie Digmaier, Themis Graciano, Pilar Rodriguez**, pela contribuição tanto intelectual como na execução do estudo.

Aos *colegas e amigos* do grupo PeixeGen, **Alexandra, Luiz Alexandre, Dany Tais, Daniele, Melanie, Juliana, Sheila, Fernanda, Thiago, Daniel, Fernanda Tanamati, Fernanda Braz, Eline, Bruna e Monica**, pelos bons momentos de bate-papo, troca de conhecimentos e auxílio na parte de campo deste trabalho.

Aos estagiários, **Marciano, Luciano Barreto, Arnaldo, Renato, Mauricio, Dayane, Laiane, Luiz, Igor, Laziele, Agenor e Porfilho**, pelo auxílio na execução da pesquisa.

Aos meus amigos de república, **Fábio Cortez e Rodrigo de Souza**, pela fiel amizade e companheirismo.

Aos amigos do grupo de pesquisa *Aquam/UFRGS* e UFPEL **Diego, Diones, Liane, Raquel, Luiz, Maira, Felipe, Leandro, Fernanda**, pela grande amizade e auxílio nas análises de laboratório.

Aos meus familiares, **tios e tias, primos e primas**, para colocar os nomes e tudo que representam em minha vida, é necessário uma dissertação inteira.

Aos funcionários da estação de piscicultura, **Victor, Geraldo e Cleiton**.

Aos amigos e funcionários da empresa Delcious Fish, **Rogério Barreto, Anderson, Vagner, Carlos Henrique e Janildo**, pela ajuda incondicional e amizade.

A empresa Delcious Fish, pela possibilidade da execução e realização do projeto.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPZ) e ao Departamento de Zootecnia (DZO).

Aos funcionários do PPZ e do DZO.

Ao CNPq (Conselho nacional de pesquisa), pela bolsa concedida.

...Enfim, agradeço a todos que encontrei nesta caminhada, mesmo que o nome eu não tenha mencionado, ou que, de alguns, nem recorde os nomes, rostos e atos. Todos os encontros me proporcionaram uma mudança em minha vida. Portanto...

***Muito Obrigado a Todos!***

## BIOGRAFIA DO AUTOR

DARCI CARLOS FORNARI, filho de Dalci Fornari e Ibraina Fornari, nasceu em Ubiratã, Paraná, no dia 23 de abril de 1978.

Estudou em escola pública até a conclusão do ensino médio em 1996, no Colégio Estadual Campina da Lagoa, Campina da Lagoa-PR.

Em 2004, concluiu o curso de Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá.

Em 2009, obteve o título de Mestre em Produção Animal (Piscicultura) pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de piscicultura (Criopreservação de embriões de peixe), foi orientado pelo Dr. Ricardo Pereira Ribeiro.

Em março de 2009, iniciou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Doutorado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, continuando com os estudos na área de piscicultura.

No dia 08 de junho de 2012, submeteu-se à banca para defesa da Tese.

# ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	3
I. INTRODUÇÃO .....	5
II REVISÃO DE LITERATURA .....	6
2.1 Espécie: Tambaqui ( <i>Colossoma macropomum</i> ) .....	6
2.2 Agentes crioprotetores.....	8
2.3 Agentes crioprotetores para embriões de peixes e sua toxidez.....	9
2.4 Resfriamento.....	11
2.5 Congelação.....	12
2.6 Vitrificação.....	14
2.7 Injúrias celulares ocasionadas pelo processo de criopreservação.....	15
2.8 Referências .....	17
III. OBJETIVO GERAL .....	22
IV. Protocolo de resfriamento para embriões de tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> .....	23
Resumo.....	23
Abstract.....	23
Introdução.....	24
Material e métodos.....	25
Resultados.....	28
Discussão.....	30
Referências.....	33
V. Congelação de embriões de tambaqui ( <i>Colossoma macropomum</i> .....	36
Resumo.....	36
Abstract.....	37
Introdução.....	37
Material e Métodos.....	39
Resultado e discussão.....	43
Referências.....	54
VI. Solução crioprotetora para vitrificação de embriões de tambaqui ( <i>Colossoma macropomum</i> ).....	58
Resumo.....	58
Abstract.....	58
Introdução.....	59
Material e Métodos.....	61
Resultados.....	65
Discussão.....	70
Conclusão.....	74
Agradecimento.....	74
Referências .....	74
Conclusões gerais.....	77

## ÍNDICE

## LISTA DE TABELAS

	Páginas
IV. CONGELAÇÃO DE EMBRIÕES DE TAMBAQUI ( <i>Colossoma macropomum</i> )	
Tabela 1. Probabilidade (%) da presença de córion (PC) e das injúrias, vitelo extravasado (VE) e blastoderme danificado (BD) nas diferentes etapas do processo de congelação dos embriões de tambaqui ( <i>Colossoma macropomum</i> ).....	32
V. CRIOPROTETOR PARA VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES DE TAMBAQUI ( <i>Colossoma macropomum</i> )	
Tabela 1. Eclosão média (%) de larvas de <i>C. macropomum</i> , quando expostos os embriões em diferentes crioprotetores. ....	53
Tabela 2. Ocorrência (%) de injúrias causada pelo processo de vitrificação de embriões de <i>C. macropomum</i> , durante dois minutos em 20% de crioprotetores DMSO e metanol.....	58
VI. PROTOCOLO DE RESFRIAMENTO PARA EMBRIÕES DE TAMBAQUI <i>Colossoma macropomum</i>	
Tabela 1. Composição (%) das soluções crioprotetoras usadas no resfriamento de embriões de <i>C. macropomum</i> .....	71
Tabela 2. Taxa de eclosão de larvas de <i>Colossoma macropomum</i> submetidas a diferentes soluções crioprotetoras estocadas a -8°C/seis horas.....	73

## LISTA DE FIGURAS

### II. REVISÃO DE LITERATURA

#### 2.1. ESPÉCIE: TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

	Página
Figura 1. Tambaqui ( <i>Colossoma macropomum</i> ).....	07
Figura 2. Embrião de <i>Colossoma macropomum</i> , A = córion; B = blastoderme; C = vitelo e D = espaço perivitelino.....	08

### IV. CONGELAÇÃO DE EMBRIÕES DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

	Página
Figura 1. Imagem de embrião de <i>Colossoma macropomum</i> , no estágio de pós-gastrulação, 95% de epibolia (fechamento do blastóporo), obtida em esteriomicroscópio 2,5X.....	27
Figura 2. Probabilidade (%) de preservação de córion e ocorrência de injúrias (extravasamento de vitelo e blastoderme danificado) em embriões de <i>Colossoma macropomum</i> submetidos às curvas de resfriamento.....	31
Figura 3. Imagem de microscopia de varredura mostrando o córion intacto do embrião de tambaqui ( <i>Colossoma macropomum</i> ).....	33
Figura 4. Imagem de microscopia de varredura mostrando o córion danificado de embrião de tambaqui ( <i>Colossoma macropomum</i> ) após o processo de criopreservação.....	34
Figura 5. Probabilidade (%) de preservação do córion de embriões de <i>Colossoma macropomum</i> durante as etapas do processo de criopreservação em diferentes curvas de resfriamento.....	34
Figura 6. Imagem de microscopia de varredura mostrando o vitelo do embrião de tambaqui ( <i>Colossoma macropomum</i> ) após o processo de criopreservação.....	36
Figura 7. Imagem de microscopia de varredura mostrando injúrias no vitelo do embrião de tambaqui ( <i>Colossoma macropomum</i> ) após o processo de criopreservação.....	37
Figura 8. Probabilidade (%) de extravasamento de vitelo em embriões de <i>C. macropomum</i> durante as etapas do processo de criopreservação em diferentes curvas de resfriamento.....	38
Figura 9. Imagem de microscopia de varredura mostrando injúrias no blastoderme de embrião de tambaqui ( <i>Colossoma macropomum</i> ) após o processo de criopreservação.....	39
Figura 10. Probabilidade (%) de injúrias no blastoderme de embriões de <i>Colossoma macropomum</i> durante as etapas do processo de criopreservação em diferentes curvas de resfriamento.....	40

### V. CRIOPROTETOR PARA VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

Figura 1. Esquema dos tratamentos que os embriões de <i>C. macropomum</i> foram submetidos durante os testes de toxidez com crioprotetores. DMSO	49
--	----

(Dimetil-sulfóxido), MET (metanol), GLICE (glicerol) e ETILE (etilenoglicol), com diferentes tempos de exposição, mais o controle.....	
Figura 2. Placa de acrílico composta de covas com capacidade volumétrica de 4 ml, adaptada para estocar embriões de peixes durante a fase de desenvolvimento embrionário	50
Figura 3: A – Larva de <i>C. macropomum</i> ; B – Ovo gorado. Imagem obtida em estereomicroscópio por câmera digital (2,5X).....	50
Figura 4. Toxidez de diferentes concentrações de DMSO combinado com diferentes tempos de exposição dos embriões de <i>Colossoma macropomum</i> , na taxa de eclosão das larvas.....	54
Figura 5. Toxidez de diferentes concentrações de metanol combinado com diferentes tempos de exposição dos embriões de <i>Colossoma macropomum</i> , na taxa de eclosão das larvas.....	55
Figura 6. Toxidez de diferentes concentrações de glicerol combinado com diferentes tempos de exposição dos embriões de <i>Colossoma macropomum</i> , na taxa de eclosão das larvas.....	56
Figura 7. Toxidez de diferentes concentrações de etilenoglicol combinado com diferentes tempos de exposição dos embriões de <i>Colossoma macropomum</i> , na taxa de eclosão das larvas.....	57
Figura 8 – Eletromicrografia de varredura de embriões de <i>C. macropomum</i> , após congelação e descongelação sem crioprotetor; A – blastoderme com células destruídas; B – embrião com vitelo desconfigurado e blastoderme ausente; C – Vitelo extravasado e blastoderme danificado..	58
Figura 9 – Eletromicrografia de varredura de embriões de <i>C. macropomum</i> , após congelação e descongelação utilizando solução crioprotetora contendo 20% de metanol; A – embrião com córion intacto; B – embrião com córion retirado manualmente, blastoderme danificada; C – Embrião na fase do fechamento do blastóporo apresentando injúrias celulares.....	59
Figura 10 – Eletromicrografia de varredura de embriões de <i>C. macropomum</i> após congelação e descongelação utilizando solução crioprotetora contendo 20% de DMSO na imagem A; 20% de etilenoglicol B e 20% de glicerol na imagem C. A – embrião com blastoderme danificado e córion destruído; B – microporos com injúrias; C – vitelo aparentemente danificado.....	59

## VI. PROTOCOLO DE RESFRIAMENTO PARA EMBRIÕES DE TAMBAQUI *Colossoma macropomum*

Figura 1. Embrião de <i>Colossoma macropomum</i> no estágio de fechamento do blastóporo.....	70
Figura 2. Palhetes com embriões de <i>C. macropomum</i> após o resfriamento e descongelamento. 2A: coloração esbranquiçada; 2B: coloração translúcida (setas).....	72
Figura 3. Probabilidade (%) de eclosão de embriões de <i>C. macropomum</i> após o resfriamento -8°C estocados por seis horas em diferentes soluções contendo 10% de metanol (Meta); glicerol (Glice); etilenoglicol (Etile) e dimetilsulfóxido (DMSO) associado a duas concentrações de sacarose 8,5 e 17%.....	73

## RESUMO

A criopreservação do material genético de peixes tornou uma ferramenta imprescindível, tanto para conservação de biodiversidade como para produção. No entanto, estocar embriões de peixes em nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) e conservar por tempo indeterminado ainda não é possível. Recentemente, a evolução nas pesquisas com criopreservação possibilitou estocar embriões a  $-8^{\circ}\text{C}$ , por até 24 horas. Este fato aponta a possibilidade de criopreservar embriões de peixe, e a biotécnica de resfriamento por curto período já tem aplicações práticas. O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência de diferentes crioprotetores nos processos da criopreservação (congelamento, vitrificação e resfriamento) de embriões de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Embora parte dos objetivos propostos tenha sido alcançados, nos testes de criopreservação, somando ao esclarecimento dos aspectos importantes quanto aos danos causados aos embriões, existem ainda muitas etapas para tornar viável a criopreservação de embriões de peixes. Nos testes, foram identificadas injúrias nos embriões em todas as etapas do processo de congelamento, sendo a fase com maior incidência na estabilização em  $-35^{\circ}\text{C}$  e após a submissão em nitrogênio líquido e posterior descongelamento. No momento do “seeding” (indução a cristalização a  $-7^{\circ}\text{C}$ ), além de menor ocorrência de injúrias, maior porcentagem de embriões com córion foram verificados. As curvas de resfriamento nos testes de congelamento não evitaram a formação de cristais de gelo, o que inviabilizou a congelamento dos embriões de *C. macropomum*. No experimento de vitrificação, o metanol 20% com dois minutos de exposição pré-imersão ao nitrogênio líquido preservou o córion e algumas estruturas celulares. Embora tenha evitado maiores danos não foi suficiente para evitar a mortalidade dos embriões, o que abre perspectivas para continuidade nos estudos em criopreservação de embriões de peixes. Etilenoglicol, DMSO e glicerol foram tóxicos nas concentrações mais elevadas (20 e 30%), não sendo interessante para a vitrificação dos embriões de *C. macropomum*. Nos testes de resfriamento a  $-8^{\circ}\text{C}$ , os

tratamentos com etilenoglicol, glicerol e DMSO associados à sacarose não resultaram em respostas satisfatórias. Para armazenar embriões de *C. macropomum* a  $-8^{\circ}\text{C}$ , por um período de seis horas, sugere-se soluções crioprotetoras com sacarose 17% associada ao metanol 10%.

**Palavras-chave:** biotecnologia, conservação, crioprotetores, genética, produção animal, reprodução

## ABSTRACT

Cryopreservation of genetic material of fish has become a tool essential for preservation of biological materials and production. However, stocking of fish embryos in liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) and maintain indefinitely is not yet possible. Recently, developments in research on cryopreservation allowed storing embryos at  $-8^{\circ}\text{C}$  for 24 hours. This indicates the possibility of fish embryo cryopreserving, moreover, the biotechnical cooling for a short time already has practical applications. The present study aimed to evaluate the efficiency of different cryoprotectants to the processes of cryopreservation (freezing, vitrification and cooling) of tambaqui embryos (*Colossoma macropomum*). Despite not having succeeded in tambaqui embryos cryopreservation important points has been clarified as related to damage to the embryos. Injuries and morphological changes in embryos were identified at all stages of the freezing process, being higher with stabilization at  $-35^{\circ}\text{C}$  after being submerged in liquid nitrogen and thawed. At the moment of the seeding besides a lower incidence of injuries, a higher percentage of embryos with chorion were observed. The freezing curve protocols tested have not prevented the formation of ice crystals, thus turning unfeasible their embryonic embryos *C. macropomum* freezing. In the experiment of vitrification the methanol 20% with two-minutes of pre-immersion in exposure to liquid nitrogen, preserved the chorion and some cellular structures. Although it avoided further damage was not sufficient to prevent mortality of embryos, these results open perspectives for continued studies on cryopreservation of fish embryos. Ethylene glycol, glycerol and DMSO were toxic at higher concentrations (20 and 30%) not being interesting for the vitrification of embryos *C. macropomum*. In tests of cooling to at  $-8^{\circ}\text{C}$  treatments with ethylene glycol, glycerol and DMSO associated with sucrose did not result in satisfactory answers. To store embryos of *C. macropomum* at  $-8^{\circ}\text{C}$  for a period of six hours is suggested cryoprotectant solutions with 17% sucrose combined with 10% methanol.

**Key words:** biotechnology, conservation, cryoprotectors, genetics, animal production, reproduction.

## I. INTRODUÇÃO

O desaparecimento de espécies de peixes na natureza é imensurável, resultado de inúmeras ações antropogênicas, como; sobrepesca, desmatamento de mata ciliar, poluição urbana, assoreamentos, barragens de rios para hidroelétricas e uso indiscriminado de agrotóxicos. Tal custo ambiental e de oportunidade de mercado (piscicultura) desperta os grupos científicos para a problemática e leva a intensificação dos estudos sobre a preservação de material genético. Embora se consiga de forma eficiente a criopreservação de sêmen o mesmo não acontece ainda com embriões e oócitos de peixes (Zhang et al., 2004; Herraéz, 2009, Fornari et al., 2010). Todavia, para contribuir efetivamente na minimização dos impactos negativos, faz-se necessário o desenvolvimento de biotécnicas de criopreservação como forma de garantir a preservação por tempo indeterminado, e conseqüentemente, a formação de bancos de germoplasma completos, conforme foi sugerido por Harvey (2000). Assim gametas obtidos de populações silvestres ou de cativeiros poderão ser preservados por um curto ou longo período em programas de reprodução, e posteriormente utilizados na conservação de recursos genéticos ou para a condução de estudos de melhoramento animal (Gwo, 2000; Gorman, 2000). Esse tipo de tecnologia, permitirá o fornecimento de alevinos ao longo do ano, principalmente nas entressafras e, por fim, como componente experimental para estudos avançados, tais como transferência de genes (Chao & Liao, 2001).

A congelação de embriões envolve processos tanto físicos como químicos, relativo ao controle da variação de temperatura (gradual ou brusca), a avaliação da permeabilidade dos crioprotetores para as células (soluções composta por açúcar e álcool) e da toxidez dos crioprotetores (Bart, 2000; Ninhaus, 2004; Fornari et al., 2010). Permite ainda a avaliação de um conjunto de fatores biológicos que dificultam a conservação de embriões sob baixas temperaturas, tais como: (I) tamanho do ovo, resultando em uma reduzida razão entre a superfície e o volume, que pode retardar o fluxo/influxo da água e do crioprotetor; (II) grande

tamanho das células, podendo facilmente ser rompida durante a congelação; (III) a complexa compartimentalização entre o blastoderme e o vitelo, que possuem diferentes propriedades de permeabilidade; (IV) membranas semipermeáveis como o córion podem dificultar a entrada e saída de água e do crioprotetor; (V) potencial de suscetibilidade do embrião a danos pelo resfriamento, sendo esse inerente a cada espécie (Harvey, 1983; Stoss, 1983; Zhang & Rawson, 1995; Hagerdorn et al. 1997; Herraéz, 2009).

Dessa forma vários fatores ainda dificultam a eficiência do processo da criopreservação de embriões de peixes, e o conhecimento de todas as etapas para identificar quando e como ocorrem as alterações morfológicas danosas aos embriões, poderá minimizar ou até mesmo corrigir e permitir avanços para o sucesso desta biotecnologia.

## II. REVISÃO DE LITERATURA

### **2.1. Espécie: Tambaqui (*Colossoma macropomum*)**

O tambaqui (Figura 1) é uma espécie pertencente à família Characidae e subfamília Serrasalminae (Graças & Pavanelli, 2007), sendo um peixe de grande porte, podendo na natureza medir 1 m de comprimento e pesar 45 kg. A maturidade sexual é atingida entre o terceiro e quarto ano de vida. É um peixe que realiza grandes migrações durante a reprodução. Em cativeiro, é relativamente fácil a obtenção de gametas de qualidade, através de técnicas de reprodução artificial (Castagnolli e Zuim, 1985; Lopera-Barrero et al., 2011).

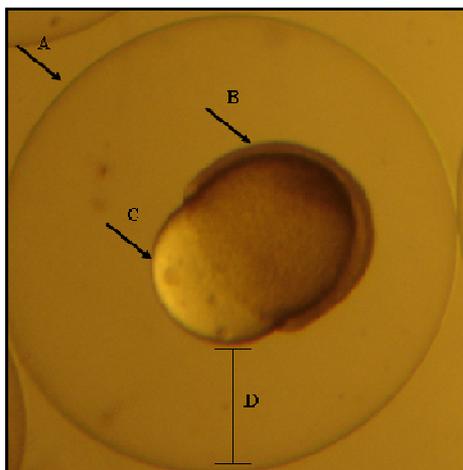


**Figura 1.** Tambaqui (*Colossoma macropomum*), exemplar do programa de melhoramento genético Aquabrazil.

É uma das espécies mais importantes para a pesca profissional da Amazônia e já apresenta visíveis pausas de sobrepesca, em redução no volume de pesca e tamanho de captura (Lopera-Barrero et al., 2011).

É a espécie nativa mais cultivada no Brasil, com volume cada vez maior crescente (FAO, 2010), e faz parte do programa de melhoramento genético de peixes nativos do Brasil (Embrapa, Universidades e empresas privadas que constituem a grupo Aquabrazil), tornando fundamental o desenvolvimento de biotecnologia para a criopreservação.

O embrião de tambaqui apresenta diâmetro médio de 2,7 mm, sendo que o espaço perivitelino representa cerca de 30% do tamanho do ovo (Figura 2). A diferenciação do embrião se dá em aproximadamente seis horas e a eclosão ocorre em 14 horas após a fecundação, em temperatura média de 28°C (Botero et al., 2004).



**Figura 2.** Embrião de *Colossoma macropomum*, **A** = córion; **B** = blastoderme; **C** = vitelo e **D** = espaço perivitelino.

## 2.2. Agentes crioprotetores

Agentes crioprotetores são essenciais ao processo de criopreservação de células, porque em sua ausência ocorre a formação de cristais de gelo, que são letais para as células (Polge, 1949; Denniston et al., 2000; Leibo, 2000). Por outro lado, apesar de necessário, a toxidez desses agentes pode causar danos irreparáveis (injúrias) às células, principalmente durante a entrada ou saída das mesmas (Chao & Liao, 2001). A mudança abrupta do volume celular, resultante da rápida introdução e remoção dos crioprotetores, pode acarretar severos danos estruturais (Renard & Cochard, 1989). As causas de injúrias dos crioprotetores as células podem ser de origem osmótica, bioquímica ou físico-química (Fahy, 1983). Assim, para a evolução dos estudos de criopreservação, torna-se importante, identificar nas diferentes etapas do processo de congelação ou vitrificação a ocorrência de alterações físicas e ou mecânicas, correlacionando-as ao tipo e concentração do crioprotetor (Renard & Cochard, 1989).

Os crioprotetores são classificados de acordo com a forma de ação nas células. Substâncias como glicerol, dimetil-sulfóxido (DMSO), propileno-glicol, etileno-glicol e metanol, de baixo peso molecular são conhecidos como agentes crioprotetores intracelulares, que atravessam as membranas celulares com relativa facilidade (Denniston et al., 2000),

promovendo a desidratação e evitando a formação de cristais de gelo no interior das células (Schneider & Mazur, 1984). Por outro lado, moléculas com alto peso molecular e que, portanto, não permeiam as células, como sacarose, glicose, lactose, polivinilpirrolidona (PVP), rafinose, manitol, entre outros, são considerados crioprotetores extracelulares (Niemann, 1991; Denniston et al., 2000), com a função de auxiliar na desidratação intracelular atuando na pressão osmótica (saída/entrada do crioprotetor intracelular), evitando principalmente os danos às proteínas de membranas (Borland et al., 1976), e alterando a formação dos cristais para um tamanho e formato inócuo (Palaz & Mapletoft, 1996).

### **2.3. Agentes crioprotetores para embriões de peixes e sua toxidez**

A toxidez dos crioprotetores pode ser verificada em uma série de estudos realizados com embriões de diferentes espécies de peixes. Essa toxidez pode variar com a espécie e estágio de desenvolvimento embrionário. Para embriões de “red drum” (*Sciaenops ocellatus*) Robertson et al. (1988) testaram glicerol, DMSO, etileno-glicol, metanol, sacarose e sal marinho e observaram que o metanol e o DMSO apresentaram menor toxidez para a espécie que os demais crioprotetores testados. Porém, para embriões de “turbot” (*Scophthalmus maximus*), o DMSO foi menos tóxico que o metanol e o etileno-glicol no estudo realizado por Cabrita et al. (2003). A ação tóxica do crioprotetor também pode estar relacionada com as fases do desenvolvimento do embrião, como demonstraram Dinnyés et al. (1998a) em embriões de carpa (*Cyprinus carpio*). Em estádios de mórula e segmentação, o DMSO foi menos tóxico que o metanol. Por outro lado, quando os batimentos cardíacos dos embriões de *C. carpio* eram perceptíveis, o metanol foi menos tóxico. A concentração do crioprotetor e temperatura também influenciam na toxicidade do crioprotetor. Concentrações acima de 2,0 M de metanol, a temperatura de 4°C, são letais para embriões de *Labeo rohita* e *Catla catla* no início da formação da nadadeira caudal (Ahammad et al., 1998). Por outro lado, para embriões de “mrigal” (*Cirrhinus mrigala*) houve 100% de mortalidade mesmo na

concentração de 1,0 M. Embriões de “zebrafish” (*Brachydanio rerio*), no estágio em que os batimentos cardíacos eram percebidos, Zhang & Rawson (1995) mostraram que a 0°C, o metanol a 1,0 M foi mais eficiente na viabilidade por 18 horas (sobrevivência de 78%) do que na concentração de 2,0 M. Entretanto, quando a temperatura passou para -5°C (18 horas também) a concentração de 2,0 M manteve 95% dos embriões viáveis, enquanto na concentração de 1,0 M, caiu para 33,3%. Fornari et al. (2012) destacaram o uso de metanol 9% associado a sacarose para o armazenamento de embriões de pacu (*P. mesopotamicus*) a -8°C, por até 24 horas. Estudando embriões de *C. carpio*, em estágio de mórula e 50% de gastrulação, expostos a soluções crioprotetoras de 1,0 M por uma hora a temperatura de 4°C, Dinnyés et al. (1998b) observaram maior susceptibilidade a toxidez primeiro ao glicerol, em seguida ao DMSO e por último ao metanol. Porém, quando os autores mantiveram os mesmos tratamentos, utilizando embriões em estágio de “heartbeat” (batimento cardíaco), o DMSO foi o mais tóxico, seguido pelo glicerol e depois o metanol.

Os agentes crioprotetores intracelulares podem ter efeito benéfico otimizado quando associado à crioprotetores de ação extracelular. Para Denniston et al. (2000) crioprotetores como a sacarose, aumentam a concentração do soluto extracelular, provocando um “fechamento” das células embrionárias para a entrada da água. Este efeito osmótico significativo exercido pela sacarose provoca uma proteção à desidratação demasiada na pré-congelação (Rawson, et al., 2000), reduzindo a toxidez dos crioprotetores (Ahammad et al., 2003). A sacarose, na concentração de 0,1 M, associada com metanol a 2,0 M, foi sugerida por Ahammad et al. (2002) como um meio de proteção eficiente para embriões de *C. carpio*. Em outro trabalho com embriões de *C. carpio*, Ahammad et al. (2003) detectaram que a concentração ideal do crioprotetor extracelular, no caso da sacarose, deve ser de 0,5 M quando associado ao metanol. Em concentrações mais elevadas de sacarose há ruptura do vitelo resultando em mortalidade total. Estes resultados foram similares aos encontrados por

Streit Jr. et al. (2007) e Fornari et al. (2012) para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), uma espécie nativa reofilica sulamericana. O metanol associado à sacarose também foi sugerido por Fornari et al. (2011) durante o resfriamento de embriões de cascudo preto (*Rhinelepis aspera*).

## 2.4 Resfriamento

A biotecnologia para conservação de gametas de peixes vem ampliando rapidamente nos últimos anos, impulsionada principalmente pela indústria aquícola (Lopera-Barrero et al., 2011). Nos últimos 25 anos, atenção especial é direcionada a criopreservação de ovos e embriões de peixes, mas até o momento os resultados são contraproducentes (Zhang et al., 2008), e com isso é utilizado o resfriamento como alternativa, podendo oferecer informações que colaborem com a criopreservação (Streit Jr. et al., 2007; Fornari et al., 2011).

A técnica de resfriamento consiste em submeter o embrião a uma solução crioprotetora e em seguida mantê-lo estocado por um determinado período em temperaturas as mais baixas possíveis (Ahammad, et al., 2003).

Os primeiros protocolos de resfriamento de embriões de peixes migradores foram descritos por Ahammad et al. (1998) para *L. rohita*, *C. catla* e *C. mrigalha* e por Ahammad et al. (2002) para *C. carpio*. Para as espécies de peixes nativas sul-americanas, Streit Jr. et al. (2007) utilizaram como espécie modelo a espécie *P. mesopotamicus*. Em estudos subsequentes, Fornari et al. (2012) com a mesma espécie, aumentaram o tempo de estocagem a  $-8^{\circ}\text{C}$ , de seis para 24 horas e Lopes et al. (2012) ajustaram a curva de resfriamento para  $1^{\circ}\text{C}/\text{mi.}$ , até o armazenamento a  $-8^{\circ}\text{C}$ . Fornari et al. (2011) sugeriram o mesmo protocolo para estocar embriões de *R. aspera* à  $-8^{\circ}\text{C}/\text{seis horas}$ . Durante os estudos de resfriamento, ao definir protocolos, além da curva de resfriamento e resistência do embrião ao frio, definiu-se os crioprotetores mais eficientes, que é outro aspecto de fundamental importância para o

domínio da técnica e a base para a criopreservação (Gwo et al., 1995; Zhang & Rawson, 1995; Hagedorn et al., 1997).

Além de contribuir para os estudos de criopreservação, os benefícios apontados a partir do domínio da biotécnica de resfriamento são inúmeros como, por exemplo: permitir a coleta de embriões em lugares remotos; mantê-los em refrigerador durante o transporte até um local em que possam ser incubados com maior segurança ou ainda na sincronia de desovas (Hagedorn & Kleinhaus, 2000; Ahammad et al., 2003; Fornari et al., 2011).

## **2.5 Congelação**

Baseados nos trabalhos desenvolvidos por Polge (1949) com sêmen de galo, surgem na década de 1970 os primeiros relatos com embriões de camundongos (Whittingham et al., 1972 e Wilmut, 1972). Esses autores concluíram que este evento só pode ser realizado através de um processo lento de congelação expresso através de curvas de congelação. Nos últimos anos, vários métodos de congelação de embriões bovinos baseiam numa curva de congelação padrão desenvolvido por Willadsen et al. (1976, 1978). Dessa forma, o processo está definido em quatro etapas: (I) submeter os embriões à solução crioprotetora e alocá-los em palhetes (0,25 ou 0,5ml); (II) definir a curva de resfriamento determinando o momento do “seeding” (indução à cristalização da solução, -6 a -9°C); (III) estabelecer a temperatura final da curva pré-transferência para o nitrogênio líquido (estabilização entre -30 a -35°C); (IV) transferência para o nitrogênio líquido e descongelação (Willadsen et al., 1976; Rawson & Zhang, 2005; Caetano et al., 2011).

Leibo & Mazur (1978) e Palasz & Mapletoft (1996) mostraram a importância da indução da cristalização do meio extracelular “seeding”, antecedendo a congelação do meio contendo os embriões, proporcionando as condições necessárias para uma retirada lenta de água do meio intracelular através da formação de gelo no espaço extracelular. Os autores fazem algumas observações sobre o procedimento de “seeding” que devem ser consideradas,

dentre elas o instrumento a ser usado para efetuar a indução da cristalização deve ter temperatura abaixo da temperatura da amostra. Não é desejável empregar instrumentos muito grandes para proceder a indução da cristalização de amostras desproporcionalmente menores, porque a massa relativa de um instrumento muito maior resfria as amostras por temperaturas muito baixas. Desse modo, os embriões são lesados caso haja neste momento congelação intracelular. Instrumentos muito pequenos também não são desejáveis, por aquecer rapidamente após ser retirados do nitrogênio líquido. O toque para a indução da cristalização deve ser realizado preferencialmente na região em que não estejam os embriões, como no menisco superior da coluna central da palheta.

A desidratação das células durante o resfriamento depende diretamente da velocidade de redução da temperatura. Curvas de resfriamento ótimas variam consideravelmente, em função das diferenças entre os tipos de células, ou seja, a quantidade de água intracelular, tamanho da célula, permeabilidade da membrana para a entrada e saída de água e, o coeficiente de temperatura (Hagedorn et al., 1997). Quando o resfriamento é suficientemente lento, ocorre a perda de água por osmose, suportando a desidratação e mantendo o equilíbrio do potencial químico da solução no meio intracelular com a água extracelular (Mazur, 1984). Porém, este mesmo autor mostra que mesmo assim, a exposição das células à solução crioprotetora causa um estresse osmótico que, dependendo da concentração, duração e temperatura de exposição na solução, pode levar a célula a entrar em colapso. Por outro lado, se o resfriamento for rápido, o potencial químico da água e da solução extracelular diminui mais rápido que a água intracelular, resultando em água intracelular remanescente que, eventualmente, forma gelo intracelular que muitas vezes é letal para as células (Zhang et al., 2008).

Nos últimos anos, vários métodos de congelação de embriões bovinos baseiam em uma curva de redução da temperatura padrão desenvolvido por Willadsen et al. (1976). Esses

trabalhos correlacionam a queda de temperatura em função do tempo obtido com velocidade de 0,3 a 1°C/minuto e, a indução à cristalização da solução crioprotetora “seeding” na temperatura de -7°C, com gradativa queda entre -33 e -35°C e posteriormente armazenado em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>).

Estudos realizados por Zhang et al. (2003) com embriões de zebrafish (*Danio rerio*) demonstraram o efeito das curvas de resfriamento; lenta (1°C/minuto); intermediária (30°C/minuto) e rápida (300° C/minuto), utilizando o crioprotetor metanol, em diferentes estádios embrionários. Os autores verificaram que o efeito do metanol foi mais pronunciado quando os embriões foram submetidos ao resfriamento lento, não apresentando diferenças significativas em relação ao controle não resfriado. Nas demais curvas de resfriamento, a taxa de eclosão após o resfriamento foi significativamente menor. Lopes et al. (2012) sugeriram no processo de resfriamento de embriões de *P. mesopotamicus*, seja aplicada a curva de resfriamento com queda de 1°C/min até atingir -8°C.

## **2.6 Vitrificação**

A vitrificação é um procedimento de congelação ultra rápido, caracterizado pela solidificação instantânea de uma solução líquida, tornando-se vítreo (Al-Hasani & Khaled, 2008). Para o processo da criopreservação é primordial o uso de crioprotetores que penetram nas células (Zhang, 2004; Herraéz, 2009). Para isso, os crioprotetores são utilizados em alta concentração, promovendo a desidratação da célula antes do processo de resfriamento rápido (Denniston et al., 2000). A solução de vitrificação contém uma combinação de crioprotetores de baixo e alto peso molecular. Os crioprotetores de baixo peso molecular penetram na célula e protegem o citoplasma durante a congelação. Por outro lado, os crioprotetores com alto peso molecular não penetram na célula, porém são agentes efetivos na desidratação extracelular (Rawson, et al., 2000; Caetano et al., 2011).

A vitrificação de embriões de peixe tem como objetivo reduzir os danos ultraestruturais a várias células, causados pela formação intra e extracelular de cristais de gelo (Rall, 1987; Kasai, 1996) e minimizando, desta maneira, os efeitos deletérios da sensibilidade ao frio dos embriões (Zhang & Rawson, 1995; Hagedorn et al., 1997).

A princípio, a alta concentração final da solução de vitrificação evita a formação de gelo no interior da célula (Rall & Fahy, 1985, Denniston et al., 2000). Para Rana (1995) as concentrações de crioprotetores não tóxicas aos embriões situam-se entre 7 e 15%. Entretanto, para Bart (2000) as concentrações de 7 a 15 % são insuficientes para o procedimento de vitrificação, havendo a sugestão de que a vitrificação seja feita em dois passos: primeiro, os embriões seriam expostos a uma solução de baixa concentração (5 a 10%) de crioprotetores para depois serem colocados, rapidamente, em outra com alta concentração (15 a 30%) de crioprotetor.

## **2.7 Injúrias celulares ocasionadas pelo processo de criopreservação**

A criopreservação pode causar danos às células por inúmeros fatores conforme destacado por Herráez (2009), como: a velocidade da curva de resfriamento “cold shock”; estresse osmótico pelas variações de concentrações do meio externo; toxicidade dos crioprotetores e o ponto de solidificação (momento em que tudo se torna vítreo).

O efeito do resfriamento depende da sensibilidade de cada tipo de célula ao choque frio, como por exemplo, em sêmen e embriões de mamíferos, que se mantêm em temperatura entre 30 e 40°C, quando submetidos a temperaturas menores que 4°C, podem sofrer uma alteração na fluidez das membranas (Adam, et al., 1995; Lahnsteiner, 2008; Herráez, 2009). No caso dos peixes de água fria, em temperaturas de 2 a 4°C os embriões não sofrem alterações, porém, entretanto, o decréscimo a -15 ou -20°C pode ser crucial para a sua viabilidade (Ahammad et al., 2002; Zhang et al., 2005).

A estrutura mais prejudicada com a redução de temperatura é a membrana plasmática que pode perder a disposição de seus lipídios que formam uma bicamada. Quando tais lipídios alcançam seu momento de transição, a membrana pode desorganizar-se e depois se tornar um pacote formando pequenas micelas. Desta forma, a formação típica do mosaíco fluido da membrana é perdida, afetando a permeabilidade e outras funções celulares (Adam et al., 1995). Os lipídios se desorganizam e as proteínas que existem entre eles formam canais permeáveis e as moléculas de reconhecimento são afetadas (Harvey, 1983). Além disso, a superfície celular tem regiões ou domínios diferentes com funções específicas. Quando se perde o mosaíco fluido durante a congelação ocorre, em muitos casos, perdas do material celular (Mazur, 1984; Cerdà, 2002; Li et al., 2008).

Segundo Billard & Zhang (2001), a criopreservação de embriões de peixes tem apresentado vários problemas associados com as injúrias causadas durante os processos de congelação e de descongelação. Quatro características em particular têm sido identificadas como possíveis responsáveis pelo insucesso das diferentes tentativas de utilização do processo: (I) o fato da maioria dos ovos de peixes serem maiores que 1 mm de diâmetro, o que resulta em uma baixa taxa de área por volume e conseqüentemente há redução da taxa de fluxo de água e dos crioprotetores durante os passos para a criopreservação; (II) a grande quantidade de vitelo e as diferentes características osmóticas dos vários compartimentos do embrião; (III) os ovos de peixe apresentam um complexo sistema de membranas (Salinas-Flores et al., 2008), sendo que algumas destas possuem baixa permeabilidade; (IV) e a alta sensibilidade ao frio, de algumas espécies, resultando em danos irreversíveis durante o processo de criopreservação. Relacionando injúrias ao processo de criopreservação Ninhaus-Silveira et al. (2008) verificaram alterações ultraestruturais após a congelação e descongelação de embriões de curimba (*Prochilodus lineatus*) e Fornari et al. (2010)

destacaram os principais danos extravasamento de vitelo, ausência de córion e blastoderme danificada, causados pelo processo de criopreservação de embriões de *P. mesopotamicus*.

A inovação com biotecnologias voltadas ao aprimoramento do manejo reprodutivo permitirá o incremento da produção aquícola que pode propiciar um cenário competitivo com outras proteínas de origem animal, bem como constituir ferramenta em programas de melhoramento genético. Percebe-se, no entanto que há um longo percurso para o domínio da técnica de criopreservação.

## 2.8 REFERÊNCIA

- ADAM, M.; RANA, K.J.; McANDREW, B.J. The effect of temperature and chorion manipulation on the permeability of rosy bard and zebrafish embryos. **CryoLetters**, Cambridge. v.18, n.2, p.16-65, 1995.
- AHAMMAD, M.M. et al. 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**, San Diego, v.37, n.4, p.318-324, 1998.
- AHAMMAD, M.M. et al. Hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryo stored at 4 and  $-2^{\circ}\text{C}$  in different concentration of methanol and sucrose. **Theriogenology**, Stoneham, v.60, n.8, p.1409-1422, 2003.
- AHAMMAD, M.M. et al. The hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos in response to exposure to different concentrations of cryoprotectant at low temperatures. **Cryobiology**, San Diego, v.44, n.2, p.114-121, 2002.
- AL-HASANI, M.D.; KHALED, M.D.Z. Future Aspects in Human Cryopreservation. **Journal of Family and Reproductive Health**. Tehran, v.02, n.01, p.1-11. 2008.
- BART, A. New approaches in cryopreservation of fish embryos. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. **Cryopreservation in aquatic species**: World Aquaculture Society. Baton Rouge cap.3, p.179-187, 2000.
- BILLARD R.; ZHANG, T. Techniques of genetic resource banking in fish. In: TAYLOR, A. FRANCIS, R. **Cryobanking the genetic resource. Wildlife conservation for the future?**. London: Taylor and Francis Books. 2001. p. 145-170.
- BORLAND, C.; BIGGERS, R.D.; LECHENE, C.P. Kinetic aspects of rabbit blastocoel fluid accumulation: An application of electrone probe abalysis. **Devolopment Biology**, Stoneham, v.50, n.2, p.201, 1976.
- BOTERO, M.; FRESNEDA, A.; MONTOYA, A.F.; ÁGUEL, M.O. 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 Ciencia e Pecuaria**, Bogotá. v.17, n.1, p.38-45, 2004.

- CABRITA, E. ROBLES, V.; CHEREGUINI, O; WALLACE, J. C.; HERRÁEZ, M.P. Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). **Cryobiology**, San Diego, v.47, n.3, p.204-213, 2003.
- CAETANO, J.P.J.; COTA, A.M.M.; LAMAITAI, R.M. Criopreservação de Embriões e Banco de Embriões. In: ALMODIN, C.G. & COSTA, R.R. (Eds.). **Criopreservação de gametas, embriões e tecidos germinativo em laboratório de fertilização in vitro**. Rio de Janeiro: Cultura Médica. 2011, p.105-117.
- CASTANHOLLI, N.; ZUIM, S.M.F. Consolidação do conhecimento adquirido sobre o pacu, *Colossoma mitrei* – Berg, 1895. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v.5, n.1, p.1-2, 1985.
- CERDÀ, J. Mecanismos fisiológicos durante la hidratación del huevo de teleósteos: hacia el desarrollo de nuevos métodos de criopreservación. **Boletín instituto español de oceanografía**, Madrid, v.18, n.1-4, p. 145-152. 2002.
- CHAO, N.H.; LIAO, I.C. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. **Aquaculture**, Amesterdan, v.197, n.1, p.161-189, 2001.
- DENNISTON, R.; MICHELET, S.; GODKE, R. A. Principles of cryopreservation. In: TIERSCH, T.R. e MAZIK, P.M. Cryopreservation in aquatic species. **World Aquaculture Society**: Baton Rouge. 2000, cap.2, p.59-74.
- DINNYÉS, A. B.; URBÁNYI, B.; BARANYAI, I. Magyary Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants: work in progress. **Theriogenology**, Amsterdan, v.50, n.1, p.1-13, 1998a.
- DINNYÉS, A. URBÁNYI, B.; BARANYAI, B.; MAGYARY, I. Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants: work in progress. **Theriogenology**, Stoneham, v.50, n.1, p.1-13, 1998b.
- FAHY, G.M. Cryoprotectant toxicity neutralizers reduce freezing damage. **Cryollets**. Londres, v.4, n.3, p.309-314, 1983.
- FORNARI, D.C.; RIBEIRO, R.P.; STREIT JR., D.P., VARGAS,L., GODOY, L., OLIVEIRA, C.A.L.; DIGMAYER, M.; GALO, J.M.; NEVES, P.R. Increasing storage capability of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos by chilling: development of a useful methodology for hatcheries management. **CryoLettrs**, Lewes, v. 33, n. 2, p. 125-133, 2012.
- FORNARI, D.C.; RIBEIRO, R.P.; STREIT JR., D.P.; GODOY, L.C.; NEVES, P.R. Effect of cryoprotectants on the survival of cascudo preto (*Rhinelepis aspera*) embryos stored at – 8°C. **Zygote**, Cambridge, v.18, n.1, p.1-6, 2011.
- FORNARI, D.C.; RIBEIRO, R.P.; STREIT JR., D.P.; VARGAS, L.; MORAES, V.G. Freezing injuries in the embryos of *Piaractus mesopotamicus*. **Zygote**, Cambridge, v.19, n.2, p.345-350, 2010.
- GORMAN, O.T. Ecological and genetic considerations for collection of gametes from wild fishes. In: TIERSCH, T.R; MAZIK, P.M. **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society. 2000, cap.8, p.319-322.
- GRAÇA, W.J.; PAVANELLI, C. S. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes**. Ed. EDUEM. Maringá. 2007. p.139.

- GWO, J.C. Cryopreservation of sperm of some marine fishes. In: TIERSCH, T.R. e MAZIK, P.M. **Cryopreservation in aquatic species**. World Aquaculture Society: Baton Rouge. 2000, cap.3, p.138-160.
- GWO, J.C.; STRAWM, K.; ARNOLD, C.R Change in mechanical tolerance and chilling sensitivity of red drum (*Sciaenopus ocellatus*) embryos during development. **Theriogenology**. Stoneham, v.43, n.7, p.1155-1161, 1995.
- HAGEDORN, M.; KLEINHANS, F.W. Problems and prospects in cryopreservation of fish embryos. In: TIERSCH, T.R. e MAZIK, P.M. (Eds.). **World Aquaculture Society**: Baton Rouge. p.179-187, 2000.
- HAGEDORN, M.; KLEINHANS, F.W.; WILDT, D.E.; RALL, W.F. Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. **Cryobiology**, San Diego, v.34, n.3, p.251-263, 1997.
- HARVEY, B. Cooling of embryonic cells, isolated blastoderms, and intact embryos of the zebra fish *Brachydanio rerio* to minus -196 Celsius. **Cryobiology**, San Diego, v.20, n.5, p.440-447, 1983.
- HARVEY, B. The application of cryopreservation in fish genetic conservation in North and South America. In: TIERSCH, T.R; MAZIK, P.M. **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society. 2000, cap.8, p.332-337.
- HERRÁEZ, M. P. Criopreservación de gametas y embriones. In: Carrillo-Estévez, M. A. (Eds.). **La reproducción de los peces: Aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura**. Madrid: Fundación Observatorio Español de Acuicultura. 2009, p.477-530.
- KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. **Animales Reproduction Science**. Stoneham v. 42, n. 3, p. 67-75, 1996.
- LAHNSTEINER F. The effect internal and external on zebrafish (*Dario rerio*) embryo. **Theriogenology**, Stoneham, v.69, n.2, p.384-396, 2008.
- LEIBO S.P., MAZUR P. Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In: DANIEL Jr., J.C. (Ed.) **Methods in Mammalian Reproduction**, New York: Academic Press, 1978. p. 179-201.
- LEIBO, S.P. Sources of variation in cryopreservation. In: TIERSCH, T.R; MAZIK, P.M. **Cryopreservation in aquatic species**. World Aquaculture Society. Baton Rouge. 2000, cap.2, p.75-83.
- LI, B.P.; WEI, Q., LIU, L. DNA integrity of Polyodon spathula cryopreserved sperm. **Journal of Applied Ichthyology**. Berlin, v.24, n.2, p.121-125, 2008.
- LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; VARGAS, L.; POVH, J.A. PAIRRA, A. As principais espécies produzidas no Brasil. In: LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; MENDEZ, L.D.V.; POVEDA-PRRA, A.R. (Eds.). **Produção de organismos aquáticos: uma visão geral no Brasil e no mundo**. Guaíba: Agrolivros. 2011, p.143-215.
- LOPES, T.; STREIT JR., D.P.; FORNARI, D.C.; OLIVEIRA, D.; RIBEIRO, R.P.; ROMAGOSA, E. Chilling curves for *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) embryos stored at -8°C. **Zygote**, Cambridge, p. 1-6, 2012.
- MAZUR, P. Freezing of live cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physics**, Horizon. v.42, n.3, p.125-247, 1984.

- NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, Stoneham, v.35, n.1, p.109-124, 1991.
- NINHAUS, A. Desenvolvimento Embrionário e Preservação Criogênica de embriões do curimatá, *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (Teleostei, Prochilodontidae). 2004. 123f. Tese (**Doutorado**) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- NINHAUS-SILVEIRA, A. FORESTI, F.; AZEVEDO, A.; AGOSTINHO, C.A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Cryogenic preservation of embryos of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae) **Zygote**, Cambridge, v.2, n.1 p.1-11. 2008.
- PALASZ A.T., MAPLETOFT R.J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. **Biotechnology Advances**, Maryland Heights, v.14, n.1 p.127-149, 1996.
- PALASZ, A.T.; MAPLETOFT, R.J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. **Biotechnology Advances**. Stoneham, v.14, n.1, p.127-149, 1996.
- POLGUE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. **Nature**, London, v.164, n.5, p.666, 1949,
- RALL, W.F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, San Diego, v.24, n.03 p.387-402, 1987.
- RALL, W.F.; FAHY, G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. **Nature**. London, v.313, n. 3, p.573-575, 1985.
- RANA, K.J. Preservation of gametes. In: BROMAGE, N.R.; ROBERTS, J.R. (eds.). **Broodstock Management and Egg and Larval Quality**. Oxford: Blackwell Science, 1995, p.53-75.
- RAWSON, D.M.; ZHANG, T. New approaches to the cryopreservation of fish oocytes and embryos. **The Role of Biotechnology**, Villa Gualino, Turin, Italy – 5-7 March, 2005.
- RAWSON, D.M.; ZHANG, T.; KALICHARAN, D.; JONGEBLOED L. Field emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy studies of the chorion, plasma membrane and syncytial layers of the gastrula-stage embryo of the zebrafish *Brachydanio rerio*: a consideration of the structural and functional relationship with respect to cryoprotectant penetration. **Aquaculture Research**, San Francisco, v.31, n.3, p.325-336, 2000.
- RENARD, P.; COCHARD, J. Effect of various cryoprotectants on Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg, Manila clam *Ruditapes philippinarum* Reeve and King scallop *Pecten maximus* (L) embryos: Influence of the biochemical and osmotic effect. **Cryolletrs**, London, v.10, n.2, 169-180, 1989.
- ROBERTSON, S.M.; LAWRENCE, A.L. ; NEILL, W.H. ; ARNOLD, C.R.; McCARTY, G. Toxicity of the cryoprotectants glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol, sucrose, and sea salt solutions to the embryos of red drum. **The Progressive Fish-Culturist**, Bethesda, v.50, n.3, p.148-154, 1988.
- SALINAS-FLORES, L.; ADAMS, S.L.; LIM, M.H. Determination of the membrane permeability characteristics of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, oocytes and development of optimized methods to add and remove ethylene glycol. **Cryobiology**, San Diego. v.56, n.2, 43-52, 2008.

- SCHNEIDER V. MAZUR P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v.21, n.1, p.68-79, 1984.
- STOSS, J. Fish gamete preservation and spermatozoa physiology. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J.; DONALDSON, E.M. **Fish Physiology**. Orlando: Academic Press, cap.6, p.305-350, 1983.
- STREIT JR., D.P., DIGMAYER, M., RIBEIRO, R.P., SIROL, R.N., MORAIS, V.G., GALO, J. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, n.42, v.8, p.1199-1202. 2007.
- WHITTINGHAM, D. G.; LEIBO, S.P.; MAZUR, P. Survival of mouse embryos by frozen to 196°C and -296°C. **Science**, Washington, v.178, n.2, p.411-414, 1972.
- WILLADSEN S.M.; POLGE, C.; ROWSON, L. E.A. Deep-Freezing of sheep embryos. **Journal of Reproduction and fertility**, Cambridge, v.46, n.2, p.151-154, 1976.
- WILLADSEN S.M.; POLGE, C.; ROWSON, L. E.A. The viability of deep frozen cow embryos. **Journal of Reproduction and fertility**, Cambridge, v.46, n.2, p.391-393, 1978.
- WILMUT, I. The effect of cooling rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. **Life Science**, Elmsford, v.1, n.02, p.71-1079, 1972.
- ZHANG, T.; ISAYEVA, A.; ADMAS, S.L.; RAWSON, D.M.. Studies on membrane permeability of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes in the presence of different cryoprotectants. **Cryobiology**, San Diego v.50, n.2, 285–293, 2005.
- ZHANG, T.; RAWSON, D.M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology**, San Diego, v.32, n.3, p.239-246, 1995.
- ZHANG, T.; RAWSON, D.M.; TOSTI, L. ; CARNEVALI, O. Cathepsin activities and membrane integrity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes after freezing to – 196°C using controlled slow cooling. **Cryobiology**, San Diego v.56, n.3, 138–143, 2008.
- ZHANG, Y.Z.; LIU X.Z.; RAWSON D.M. Effects of methanol and developmental arrest on chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryo. **Theriogenology**, Amsterdam, v.59, p.1545-1556, 2003.
- ZHANG, Y.Z.; ZHANG, S.C ; LIU, X.Z.; XU, Y.J.; HU, J.H.; XU, Y.Y.; LI, J.; CHEN, S.L. Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v.63, n.3, p.763-773, 2004.

### III. OBJETIVO GERAL

Avaliar os processos de resfriamento, congelamento e vitrificação em embriões de tambaqui (*Collossoma macropomum*) a fim de estabelecer protocolos de criopreservação.

#### IV. Protocolo de resfriamento para embriões de tambaqui *Colossoma macropomum*

**Darci Carlos Fornari<sup>1</sup>**

<sup>(1)</sup>Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Zootecnia, Av. Colombo, 5790 - Bloco J45, CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. E-mail: [darci.peixegen@gmail.com](mailto:darci.peixegen@gmail.com)

\*Bolsista do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq)

**Resumo:** Objetivou-se avaliar diferentes soluções crioprotetoras no resfriamento a -8°C/seis horas em embriões de tambaqui *Colossoma macropomum*. Foram selecionados 300 embriões viáveis, na fase de pós-gastrulação e submergidos em soluções crioprotetoras compostas por crioprotetores intracelulares: etilenoglicol, glicerol, metanol e DMSO na concentração de 10% combinando com duas concentrações de crioprotetor extracelular, sacarose 8,5 e 17% e diluídos em água destilada para completar 100% da solução. Após dois minutos nas soluções de resfriamento, 30 embriões de cada tratamento foram alocados em palhete de 0,5 ml. Imediatamente foram submetidos à redução gradual de temperatura (1°C/min) até atingir -8°C e permaneceram estocados por seis horas. Após o tempo de armazenamento sob resfriamento os embriões foram retirados e transferidos para incubadoras de quatro litros, e, observou-se a taxa de eclosão. Etilenoglicol, glicerol e DMSO associados à sacarose nas duas concentrações não foram eficientes como crioprotetores. Para o resfriamento de embriões de *C. macropomum* a -8°C, por seis horas, sugere-se utilizar uma solução crioprotetora composta de sacarose 17% associada ao metanol 10%.

**Palavras-chave:** biotecnologia, criopreservação, crioprotetor, reprodução, sacarose

##### **Cooling protocol for embryos of tambaqui *Colossoma macropomum***

**Abstract:** The objective was to evaluate different cryoprotectant solutions for cooling at -8 °C / six hours in embryos of tambaqui *Colossoma macropomum*. 300 embryos were selected in the post-gastrulation and submerged in cryoprotectant solutions consisting of intracellular cryoprotectants: ethylene glycol, glycerol, methanol and DMSO at a concentration of 10% combined with two concentrations of extracellular cryoprotectant, sucrose 8.5 and 17% diluted with distilled water to complete 100% of the solution. After two minutes in cooling solutions, 30 embryos per treatment were placed in 0.5 ml pallet. Immediately submitted to gradual lowering of temperature (1°C/min) up to -8°C and remained stored for six hours. After the storage time under cooling the embryos were removed and transferred to incubators of four liters, and observed the hatching rate. The results with ethylene glycol, glycerol, sucrose and DMSO associated with the two concentrations were not effective. For the cooling of embryos *C. macropomum* at -8°C for six hours it is suggested to use a cryoprotectant solution comprising 17% sucrose combined with 10% methanol.

**Key words:** biotechnology, cryopreservation, cryoprotectant, reproduction, sucrose

### **Introdução**

A criopreservação de embriões de peixes até o presente momento não é uma tecnologia dominada, apesar de inúmeros esforços (Hagedorn et al., 2004; Zhang et al., 2004; Lahnsteiner, 2008; Fornari et al., 2010), no entanto, a técnica de resfriamento de embriões é desenvolvida com eficiência e com aplicação prática (Ahammad et al., 2002; Streit Jr. et al., 2007; Fornari, 2012). Através desta biotecnologia é possível resgatar embriões de lugares remotos (Ahammad et al., 2003), sincronizar desovas para otimizar incubadoras no laboratório de produção, facilitar a logística no intercâmbio de material genético entre pisciculturas ou na condução de ensaios científicos (Gwo, 2000; Gorman, 2000).

Um aspecto importante da pesquisa com resfriamento está relacionado, a identificação da capacidade criopreservante dos crioprotetores, principalmente porque nesse processo se trabalha com a faixa de temperatura crítica para a sobrevivência do embrião. O efeito benéfico dos crioprotetores aos embriões em temperaturas negativas, de acordo com Mazur (1977) acontece no momento de submeter uma suspensão celular contendo crioprotetores à temperatura ao redor de  $-5^{\circ}\text{C}$ . De acordo com o autor, tanto as células como o meio circundante provocam a redução do ponto de solidificação da solução, em função da adição de substâncias crioprotetoras. O autor ainda atribuiu que em temperaturas entre  $-5$  e  $-15^{\circ}\text{C}$ , o meio se torna vítreo e ocorre propensão à formação dos cristais de gelo, tornando esta faixa de temperatura a mais crítica durante o processo de resfriamento. De acordo com Streit Jr. et al. (2004) estas observações são extremamente importantes para as pesquisas no desenvolvimento de um protocolo de criopreservação de embriões de peixes.

Para os estudos de resfriamento de embriões é imprescindível o uso de crioprotetores (Streit Jr. et al., 2004; Fornari et al., 2012) que são classificados de acordo com sua ação, sendo intracelulares, metanol, glicerol, etilenoglicol, DMSO (dimetilsulfóxido) e

extracelulares, sacarose, glicose e trealose (Niemann, 1991; Reichenbach et al., 2001; Herraéz, 2009; Costa & Matos, 2011). A desidratação completa é fundamental para evitar a formação de cristais de gelo no interior do embrião. A eficiência consiste na penetração completa e ajustada com a toxidez de cada crioprotetor. Na otimização do uso de uma solução crioprotetora eficiente, os crioprotetores intracelulares, segundo Denniston et al. (2000) devem estar associado a crioprotetores extracelulares. Estes autores justificam que, açúcares possuem efeitos vantajosos em virtude do tamanho e composição de suas moléculas. Existe forte interação entre o tipo e a concentração do crioprotetor segundo Streit Jr. et al. (2007) que pode apresentar resultados distintos entre espécies para cada tipo e concentração do crioprotetor. Conforme foi relatado por Zhang (2005), torna-se importante a definição de um protocolo de resfriamento para cada espécie, principalmente para as de interesse econômico.

De um modo geral as espécies reofilicas vêm sofrendo drástica redução dos seus estoques em decorrência das construções e operacionalização de usinas hidroelétricas, poluições, devaste de matas ciliares, redução das lagoas marginais e pesca predatória (Botero et al., 2004). O *C. macropomum* é uma espécie reofilica pertencente à bacia Amazônica e Orinoco (Graça & Pavanelli, 2007), de fundamental importância na pesca profissional e para o cultivo. Com grande potencial zootécnico e uma boa quantidade de informações científicas disponível, o *C. macropomum* se tornou a principal espécie para o cultivo na região centro-oeste e norte do Brasil estando presente em 24 dos 27 estados brasileiros (Lopera-Barrero et al., 2011), o que motivou o desenvolvimento do programa de melhoramento genético da espécie.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi testar diferentes soluções crioprotetoras a fim de estabelecer um protocolo de resfriamento a  $-8^{\circ}\text{C}$ /seis horas para embriões de *C. macropomum*.

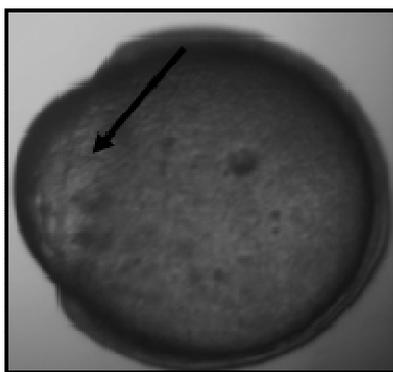
## Material e métodos

### *Obtenção dos embriões*

Para obtenção dos embriões, foram utilizadas cinco fêmeas e 10 machos, com média de 5,5 kg e 5,3 kg, respectivamente. Os animais que apresentaram características reprodutivas secundárias foram induzidos a reprodução com extrato de hipófise de carpa e mantidos em caixas circulares de 500l até o momento da extrusão. Após a fecundação artificial os embriões foram alocados em incubadoras de 200 litros e foi acompanhado o desenvolvimento embrionário.

### *Resfriamento dos embriões*

Com o fechamento do blastóporo (Figura 1), que ocorreu seis horas após a fecundação na temperatura de  $27\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  foram selecionados 1400 embriões viáveis.



**Figura 1.** Embrião de *Colossoma macropomum* no estágio de fechamento do blastóporo.

Para compor as soluções foi usado como base o protocolo de Streit Jr. et al. (2007) que trabalhou com embriões de *Piaractus mesopotamicus*. Os crioprotetores metanol, DMSO, glicerol e etilenoglicol na concentração de 10% foram associados a duas concentrações de sacarose 8,5 e 17% e para completar a solução foram diluídos em água destilada (Tabela 1). As soluções crioprotetoras foram distribuídas no volume de 5 ml, alocadas de forma serial em placa de *petri* e os embriões foram mergulhados por dois minutos e após esse tempo de exposição foram armazenados em palhetas de 0,5 ml e submetidos ao processo de resfriamento.

**Tabela 1.** Composição (%) das soluções crioprotetoras usadas no resfriamento de embriões de *C. macropomum*.

Tratamento	Crioprotetor					Água <sup>(6)</sup>
	Sac <sup>(1)</sup>	Eti <sup>(2)</sup>	Gli <sup>(3)</sup>	Met <sup>(4)</sup>	DMSO <sup>(5)</sup>	
1	17,1	9	-	-	-	73,9
2	17,1	-	9	-	-	73,9
3	17,1	-	-	9	-	73,9
4	17,1	-	-	-	9	73,9
5	8,55	9	-	-	-	73,9
6	8,55	-	9	-	-	73,9
7	8,55	-	-	9	-	73,9
8	8,55	-	-	-	9	73,9
9 (controle)	-	-	-	-	-	100

<sup>1</sup>sacarose, <sup>2</sup>etilenoglicol, <sup>3</sup>glicerol, <sup>4</sup>metanol, <sup>5</sup>dimetilsulfóxido, <sup>6</sup>água destilada

Adotou-se o método lento de resfriamento conforme sugerido por Ahammad et al. (2003) e Lopes et al (2012) para embriões de carpa (*Cyprinus carpio*) e pacu (*P. mesopotamicus*) respectivamente. Com exceção das palhetas contendo os embriões controle (que foram diretamente para incubadora sem passar pelo resfriamento) as demais, depois de vedadas foram colocados em água com gelo a temperatura de 15°C durante 10 min. Em seguida, foram transferidos para outro recipiente a 5°C durante 10 minutos e finalmente alocadas em um refrigerador a -8°C permanecendo estocados durante seis horas.

#### *Descongelamento dos embriões*

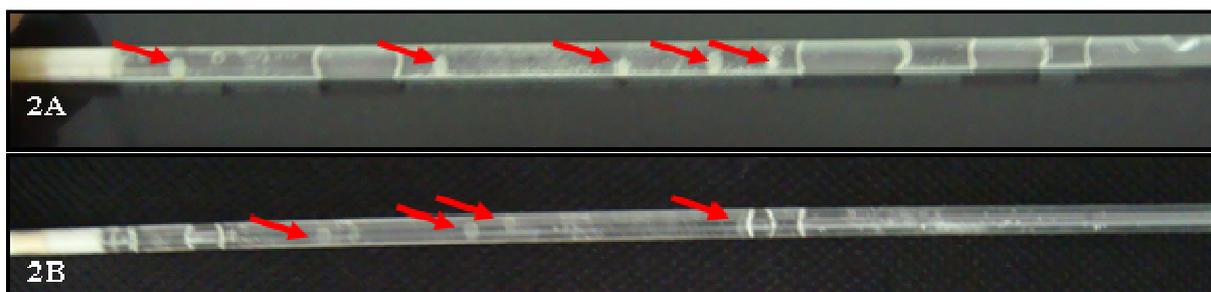
Para o descongelamento, os embriões de cada tratamento foram colocados diretamente (sem abrir) nas incubadoras (5 litros), que estavam ajustadas com renovação constante de água. Após dois minutos (para que a temperatura fosse equilibrada, antes da reidratação) os embriões foram liberados diretamente na água permanecendo até a eclosão. Quando se verificou a eclosão, as larvas e os ovos gorados foram retirados e contabilizados, obtendo o índice de eclosão. A temperatura ambiente da água foi aferida durante todo o período de desenvolvimento embrionário.

#### *Análise estatística*

Para avaliar o efeito dos tratamentos sobre a sobrevivência foi utilizado o PROC GENMOD, avaliando as diferenças na probabilidade de sobrevivência em função dos tratamentos, utilizando a distribuição binomial com função logit

### Resultados

Após o período de seis horas de estocagem a  $-8^{\circ}\text{C}$ , apenas no tratamento controle (sem crioprotetor) foi observado grande quantidade de embriões esbranquiçados (Figura 2A), evidenciando a formação de cristais de gelo antes mesmos de serem levados a incubadora para completar o desenvolvimento embrionário. Nos tratamentos contendo crioprotetores não foi verificada coloração esbranquiçada no momento da descongelação, apresentando coloração translúcida ainda no palhete (Figura 2B).



**Figura 2.** Palhetes com embriões de *C. macropomum* após o resfriamento e descongelamento. **A** - coloração esbranquiçada; **B** - coloração translúcida (setas).

Sem o uso de crioprotetor (controle) não houve sobrevivência após a estocagem dos embriões a  $-8^{\circ}\text{C}$ /seis horas. Somente nos tratamentos contendo crioprotetor ocorreram sobrevivência de larvas de *C. macropomum*. Por outro lado, a probabilidade de sobrevivência dos embriões de *C. macropomum* foi maior ( $P < 0,05$ ) quando se utilizou a solução crioprotetora contendo metanol na concentração de 10% associado à sacarose na concentração de 17% em comparação aos demais tratamentos (Tabela 2).

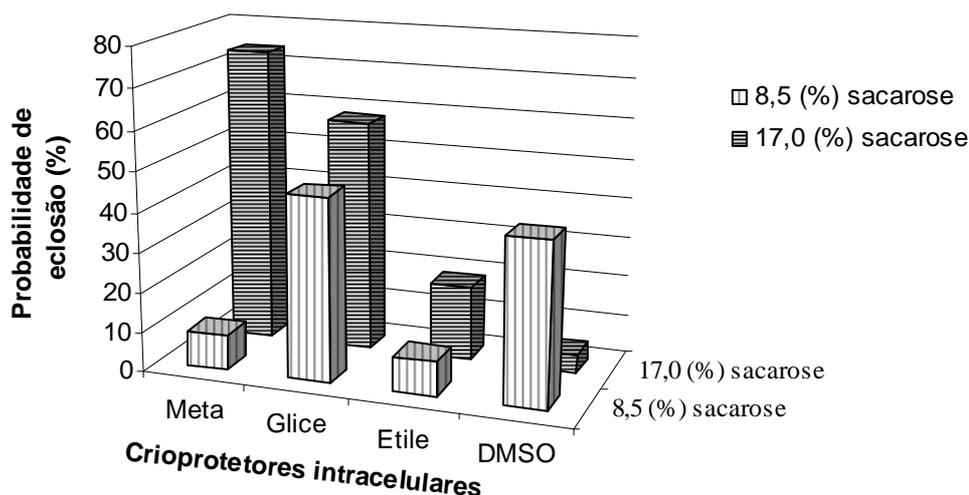
**Tabela 2.** Taxa de eclosão de larvas de *Colossoma macropomum* submetidas a diferentes soluções crioprotetoras estocadas a  $-8^{\circ}\text{C}$ /seis horas.

Sacarose (%)	Crioprotetores (10%)			
	Metanol	Glicerol	Etilenoglicol	DMSO
8,5	8,54 <sup>Bb</sup>	47,09 <sup>a</sup>	9,62 <sup>b</sup>	41,84 <sup>Aa</sup>
17,0	77,66 <sup>Aa</sup>	58,23 <sup>b</sup>	19,68 <sup>c</sup>	4,21 <sup>Bd</sup>
Controle*	0,00			

Mesmas letras maiúsculas em cada coluna e minúsculas em cada linha indicam diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

\* Apenas água destilada sem crioprotetores.

Comparando as combinações das concentrações de sacarose associadas aos crioprotetores, observou-se que para o metanol a concentração de 17% de sacarose foi mais eficiente, com grande diferença, comparado a 8,5% de sacarose ( $P < 0,05$ ). Para o glicerol, também foi mais eficiente com 17% de sacarose ( $P < 0,05$ ) comparada a 8,5%, embora com pequena diferença. O etilenoglicol acompanhou a mesma tendência com melhor resultado quando associado a 17% de sacarose ( $P < 0,05$ ), no entanto, a eclosão nos dois tratamentos (8,5 e 17% de sacarose) utilizando etilenoglicol foi baixa. Ao contrário dos outros crioprotetores, o DMSO na combinação de 8,5% de sacarose foi mais eficiente em comparação a 17% de sacarose ( $P < 0,05$ ). As melhores combinações foram 17% de sacarose associado a 10% de metanol em seguida o glicerol a 10% com sacarose a 17% (Figura 3).



**Figura 3.** Probabilidade (%) de eclosão de embriões de *C. macropomum* após o resfriamento  $-8^{\circ}\text{C}$  estocados por seis horas em diferentes soluções contendo 10% de metanol (Meta); glicerol (Glice); etilenoglicol (Etile) e dimetilsulfóxido (DMSO) associado a duas concentrações de sacarose 8,5 e 17%.

## Discussão

O fato de haver eclosão das larvas de *C. macropomum* que passaram pelo processo de resfriamento confirma a ação positiva dos crioprotetores. Outro fato bastante relevante é que os embriões de peixes tropicais possuem alta sensibilidade a baixas temperaturas (Rana & McAndrew, 1992), evidenciado no presente experimento pelas taxas de eclosão das larvas de *C. macropomum* refrigeradas sem crioprotetor.

Muito embora a combinação de todos os crioprotetores internos com a sacarose (independente da concentração) tenham resultado em taxas de eclosão de larvas de *C. macropomum*, o fator determinante para os melhores resultados foi a combinação do metanol com a maior concentração do crioprotetor externo (sacarose 17%). O protocolo utilizado na presente pesquisa se baseia nos resultados encontrados para embriões de diferentes espécies, como de *Brachydanio rerio* por Zhang & Rowson (1995); carpas (*Labeo rohita*, *Catla catla* e *Cirrhinus mrigala*) por Ahammad et al. (1998); pacu (*P. mesopotamicus*) por Streit Jr. et al. (2007) e cascudo preto (*Rhinelepis aspera*) por Fornari et al. (2011). No trabalho de Ahammad et al. (1998) com embriões de carpas, em que as concentrações de sacarose testadas variaram entre 0,5 a 2 M, os autores concluíram ser fundamental para a sobrevivência dos embriões a maior adição de sacarose nas soluções com metanol. A probabilidade de sobrevivência dos embriões de *C. macropomum* foi maior quando a concentração de sacarose passou de 8,5 para 17,0%, para todos crioprotetores internos com exceção do DMSO. Este fato quando relacionado ao crioprotetor DMSO corrobora a hipótese de que existe uma correlação entre as concentrações dos crioprotetores extracelular e intracelular, para se obter a melhor eficiência.

Uma explicação plausível para a eficiência da adição de 17 % de sacarose no protocolo de resfriamento pode estar relacionada à afirmação de Woelders (1997). Os embriões de *C. macropomum*, quando expostos as soluções crioprotetoras antes mesmo de

iniciar o processo de resfriamento, que foi de dois minutos, a sacarose possivelmente já passava a ser fundamental, produzindo uma estabilidade na membrana celular, e uma defesa adicional nas células embrionárias, principalmente contra a ação dos crioprotetores intracelulares (influxo) e da água (efluxo) evitando deformações mecânicas da camada celular (Rawson et al., 2000). A ação hidrofílica promove a eficiência da sacarose quando associado ao crioprotetor interno na proteção das células embrionária (Hubálek, 2003), no entanto, há correlação entre o tipo e concentração do crioprotetor intracelular, como foi verificado no presente experimento com *C. macropomum*, sendo o metanol menos tóxico na maior concentração de sacarose e o DMSO mais tóxico na maior concentração testada, portanto, parece estar diretamente relacionado ao efeito nocivo do crioprotetor intracelular. Segundo Rall (1987), pela presença de grupos químicos formados por hidrogênio, principalmente os formados por sulfóxidos, a concentração do açúcar pode interferir no influxo do crioprotetor intracelular, o que possibilita uma melhor ou pior desidratação e conseqüentemente a formação de cristais de gelo no interior da célula (Reichenbach et al., 2001; Hubálek, 2003).

O metanol também foi mais eficiente em estudos com embriões de outras espécies. No resfriamento de embriões de *B. rerio* Zhang & Rawson (1995) encontraram maior eficiência do metanol em relação aos crioprotetores DMSO e propano-1,2 diol ao submeter os embriões a temperaturas de 0; -5; -10 e -15°C, porém a concentração do metanol precisou ser aumentada de 1M até 4M de acordo com o decréscimo da temperatura. Resultados parecidos foram relatados por Streit Jr. et al. (2007) e Fornari et al. (2012) no resfriamento de embriões de *P. mesopotamicus*, conferindo ao metanol a maior eficiência em comparação a DMSO, glicerol e etilenoglicol.

Muito embora os resultados de taxa de eclosão a partir da solução de resfriamento com o glicerol tenham sido menores que a com metanol, ainda assim foi melhor que as soluções com DMSO e etilenoglicol. A eficiência da solução crioprotetora para o resfriamento de

embriões composta pela agregação de sacarose com o metanol sugerida para embriões de *P. mesopotamicus* (Streit Jr et al., 2007; Fornari et al., 2012) e *Rhinelepis aspera* (Fornari et al., 2011) foi determinante também para embriões de *C. macropomum*. Esta performance também foi comprovada por Bart (2000) e por Zang et al. (2003), destacando a eficiência do metanol associado a sacarose na taxa de eclosão de larvas resfriadas de *B. rerio* em comparação aos outros crioprotetores intracelular, DMSO, etilenoglicol e glicerol, idênticos ao testado em *C. macropomum*.

Um dos fatores que determina a eficácia do crioprotetor intracelular está relacionado a sua penetração e saída da célula causando a menor injúrias possível. Assim, de acordo com Adam et al. (1995) crioprotetores com menor peso molecular (62,07) como o etilenoglicol penetram e saírem com mais rapidez da célula do que o DMSO (78,13), teoricamente. No entanto, para embriões de *C. macropomum*, tanto o etilenoglicol como o DMSO, tiveram menor eficiência na manutenção da viabilidade dos embriões resfriados. Esta baixa eficiência no resfriamento de embriões de peixes parece ser recorrente para estes dois crioprotetores, e que estaria relacionado a redução da atividade enzimática no embrião, causando a morte, como relatado por Adam et al. (1995) que apontaram como sendo os causadores de injúrias em embriões de rosy barb (*Puntius conchoni*) e zebrafish (*Brachydanio rerio*). Kusuda et al. (2002) reforçam que a degeneração proteica e da membrana nuclear do embrião é provocada pela desidratação e aumento da concentração salina, quando em contato com crioprotetor e que o DMSO poderia causar esse efeito. Ainda, que a maior concentração de sacarose (17%) estaria potencializando esse efeito negativo, evidenciando que existe uma correlação entre a concentração dos crioprotetores intracelular e extracelular. Também ficou evidente que o metanol que só foi eficiente quando associado a 17% de sacarose.

Certamente futuras pesquisas, devem buscar um protocolo mais ajustado de concentrações e tipos de crioprotetores para o resfriamento de embriões. Assim em se

utilizando o metanol combinado com sacarose, ajustado em concentrações exatas para os embriões de *C. macropomum*, seria provável testar temperaturas que ultrapassam o ponto em que se torna vítrea a estrutura embrionária, a fim de estabelecer também um protocolo de congelamento.

Portanto, para embriões de *C. macropomum*, sugere-se o protocolo de armazenamento de seis horas em temperaturas de -8°C, utilizando a solução crioprotetora de metanol (10%) com adição de sacarose (17%).

### Referências

- ADAM, M.M.; RANA, K.J.; McANDREW, B.J. Effect of cryoprotectants on activity of selected enzymes in fish embryos. **Cryobiology**, San Diego, v.32, n.2, p.92-104, 1995.
- AHAMMAD, M.M. et al. The hatching of common carp (*Cyprinus carpio L.*) embryos in response to exposure to different concentrations of cryoprotectant at low temperatures. **Cryobiology**, San Diego, v.44, n.2, p.114-121, 2002.
- AHAMMAD, M.M.; BHATTACHARYYA D.; JANA B.B. Effect of different concentrations of cryoprotectant and extender on the hatching of Indian major carp embryos *Labeo rohita*, *Catla catla*, and *Cirrhinus mrigala* stored at low temperature. **Cryobiology**, San Diego, v.37, n.4, p.318-324, 1998
- AHAMMAD, M.M.; BHATTACHARYYA D.; JANA B.B. Hatching of common carp *Cyprinus carpio L.* embryo stored at 4 and -2°C in different concentration of methanol and sucrose. **Theriogenology, Stoneham**, v.60, n.8, p.1409-1422, 2003
- BART, A. New approaches in cryopreservation of fish embryos. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. (Eds.). **Cryopreservation in aquatic species**. World Aquaculture Society. Baton Rouge. p.179-187, 2000.
- BOTERO, M.; FRESNEDA, A.; MONTOYA, A.F.; ÁGUEL, M.O. 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 Ciencia e Pecuaria**. Bogotá, v.17, n.1, p.38-45, 2004.
- COSTA, R.R.; MATTOS, B. Histórico da Criopreservação. In: ALMODIN, C.G. & COSTA, R.R. (Eds.). **Criopreservação de gametas, embriões e tecidos germinativo em laboratório de fertilização in vitro**. Rio de Janeiro: Cultura Médica. 2011, p.3-8.
- DENNISTON, R.S.; MICHELET, S.; GODKE, R.A. Principles of cryopreservation. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. (Ed.). **Cryopreservation in aquatic species**. **World Aquaculture Society**. Baton Rouge, p.59-74. 2000.
- FORNARI, D.C.; RIBEIRO, R.P.; STREIT JR., D.P., VARGAS,L., GODOY, L., OLIVEIRA, C.A.L., DIGMAYER, M., GALO, J.M., NEVES, P.R. Increasing storage capability of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos by chilling: development of a useful methodology for hatcheries management. **CryoLettrs**, Lewes, v. 33, n. 2, p. 125-133, 2012.

- FORNARI, D.C.; RIBEIRO, R.P.; STREIT JR., D.P.; VARGAS, L.; MORAES, V.G. Freezing injuries in the embryos of *Piaractus mesopotamicus*. **Zygote**, Cambridge, v.19, n.1 p. 1-6, 2010.
- FORNARI, D.C.; RIBEIRO, R.P.; STREIT JR., D.P.; VARGAS, L.; MORAES, V.G. Freezing injuries in the embryos of *Piaractus mesopotamicus*. **Zygote**, Cambridge, n.19, v.2, p. 345-350, 2010.
- GRAÇA, W.J.; PAVANELLI, C. S. **Peixes da planície de inundação do alto rio paraná e áreas adjacentes**. Ed. EDUEM. Maringá, p. 78. 2009.
- HAGEDORN, M. M.; PETERSON, A.; MAZUR, P.; KLEINHANS, F.W. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option. **Cryobiology**, San Diego, v.49, n.2, p.181-189, 2004.
- HERRAEZ, M. P. Criopreservación de gametos y embriones. In: ESTÉVEZ, M. A. C., La Reproduccin de los peces: **Aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura**. Fundación Observatorio Español de acuicultura. Madrid. p. 477-530. 2009.
- HUBALEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, San Diego, v.46, n.1, p.205-229, 2003.
- KUSUDA, S.; TERANISHI, T.; KOIDE, N. Cryopreservation of chum salmon blastomeres by the straw method. **Cryobiology**, San Diego, v.45, n.1, p.60-67, 2002.
- LAHNSTEINER F. The effect internal and external on zebrafish (*Dario rerio*) embryo. **Theriogenology**, Stoneham, v.69, n.03, p.384-396, 2008.
- LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; VARGAS, L.; POVH, J.A. PAIRRA, A. As principais espécies produzidas no Brasil. In. LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; MENDEZ, L.D.V.; POVEDA-PRRA, A.R. (Eds.). **Produo de organismos aquáticos: uma visão geral no Brasil e no mundo**. Guaiba: Agrolivros. 2011, p.143-215.
- LOPES, T.; STREIT JR., D.P.; FORNARI, D.C.; OLIVEIRA, D.; RIBEIRO, R.P.; ROMAGOSA, E. Chilling curves for *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) embryos stored at -8C. **Zygote**, Cambridge, p. 1-6, 2012.
- MAZUR, P. The role intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology**, San Diego, v.14, n.3, .02, p. 251-272, 1977.
- NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, Stoneham, v.35, n.1, p.109-124, 1991.
- RALL, W.F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, San Diego, v.24, n.03 p.387-402, 1987.
- REICHENBACH, H.D.; OLIVEIRA, L.; LIMA, P.F.; SANTOS-FILHO, A.S.; ANDRADE, J.C.O. Transferência e criopreservo de embriões bovinos. In: GONSALVES P.B.; FIGUEIREDO J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas: aplicao  reproduo animal**. Ed Varela: São Paulo. Cap. 8, 2001. p.127-178.
- STREIT JR., D.P.; DIGMAYER, M.; RIBEIRO, R.P.; VARGAS, L.; DYGAMAER, M. GALO, J.M. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.8, p.1199-1202. 2007.
- STREIT JR., D.P.; RIBEIRO, R.P.; MORAES, G. V. et al. Criopreservo de embriões de peixes. **Revista Brasileira de Reproduo Animal**. Belo Horizonte, v.28, n.1, p.54-62. 2004.

- URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTO, B. GOMES, L.C. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM. p. 225-246, 2005.
- WOELDERS, H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *The Veterinary Quarterly*. Zeist, v.19, n.02, p.135-138, 1997.
- ZHANG, T.; ISAYEVA, A.; ADMAS, S.L.; RAWSON, D.M. Studies on membrane permeability of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes in the presence of different cryoprotectants. **Cryobiology**, San Diego v.50, n.2, 285–293, 2005.
- ZHANG, T.; RAWSON, D.M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology**. San Diego, v.32, n.3, p.239-246, 1995.
- ZHANG, Y.Z.; ZHANG, S.C ; LIU, X.Z.; XU, Y.J.; HU, J.H.; XU, Y.Y.; LI, J.; CHEN, S.L. Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. **Theriogenology**, Amsterdam, v.63, n.3, p.763-773, 2004.
- ZHANG, Y.Z.; LIU X.Z.; RAWSON D.M. Effects of methanol and developmental arrest on chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryo. **Theriogenology**, Amsterdam, v.59, n.03, p.1545-1556, 2003.
- ZHANG, Y.Z.; LIU X.Z.; RAWSON D.M. Effects of methanol and developmental arrest on chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryo. **Theriogenology**, Amsterdam, v.59, p.1545-1556, 2003.
- GORMAN, O.T. Ecological and genetic considerations for collection of gametes from wild fishes. In: TIERSCH, T.R; MAZIK, P.M. Cryopreservation in aquatic species. **World Aquaculture Society**. Baton Rouge, cap.8, p.319-322, 2000.
- GWO, J.C. Cryopreservation of sperm of some marine fishes. In. TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. (Eds.). **World Aquaculture Society**. Baton Rouge, cap.5, p.138-160, 2000.
- RAWSON, D.M.; ZHANG, T.; KALICHARAN, D.; JONGEBLOED L. Field emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy studies of the chorion, plasma membrane and syncytial layers of the gastrula-stage embryo of the zebrafish *Brachydanio rerio*: a consideration of the structural and functional relationship with respect to cryoprotectant penetration. **Aquaculture Research**, San Francisco, v.31, p.325-336, 2000.

## V. Congelação de embriões de tambaqui (*Colossoma macropomum*)<sup>1</sup>

Darci Carlos Fornari\*

\*Doutorando em produção animal PPZ/UEM – [darci.peixegen@gmail.com](mailto:darci.peixegen@gmail.com)

**RESUMO:** O protocolo de congelação de embriões envolve um processo complexo com várias etapas de execução; submeter o embrião a solução crioprotetora, definir a curva de

---

<sup>1</sup> Elaborado segundo normas da Pesquisa Agropecuária Brasileira

resfriamento (queda gradual da temperatura), o “seeding” (indução do estado líquido para vítreo), a transferência para o nitrogênio líquido e descongelação. Tais etapas devem estar ajustadas para evitar formação de cristais de gelo e consequentemente evitar eventuais injúrias. Portanto, objetivou-se avaliar as etapas do processo de congelação de embriões de tambaqui (*C. macropomum*) testando diferentes curvas de resfriamento a fim de estabelecer um protocolo de criopreservação. Foram utilizados 250 embriões viáveis em estágio de pós-gástrula, submetendo-os a queda gradual da temperatura de 0,25, 0,5, 0,75, 1,0 e 1,25°C por minuto em uma solução crioprotetora contendo 17% sacarose, associada a 10% de metanol. Os embriões foram guardados em pallets de 0,5ml com a solução crioprotetora e após dois minutos foram alocados em um aparelho de resfriamento “Biocom”. Quando o aparelho estabilizou em -8°C, realizou-se o “seeding”, a curva seguiu até -35°C e após estabilização a -35°C foram armazenados em nitrogênio líquido. Para cada etapa, incluindo o momento em que os embriões foram apenas mergulhados no crioprotetor e do processo da congelação, os embriões foram descongelados e as injúrias mais recorrentes (danos no córion, vitelo e blastoderme) foram avaliadas através de microscopia de varredura. Os embriões que foram apenas submergidos ao crioprotetor, sem o processo de criopreservação, não apresentaram injúrias. A ausência de córion foi verificada em maiores porcentagens nas etapas ao estabilizar em -35°C e após serem submersos em nitrogênio líquido e descongelados em comparação ao momento do “seeding”. As injúrias de vitelo extravasado e blastoderme danificado ocorreram em maiores proporções ao estabilizar em -35°C e ao descongelar. Os protocolos de curva de congelação testados não evitaram a formação de cristais de gelo, causando a deformação embrionária, inviabilizando os embriões de *C. macropomum*.

**Termos de indexação:** crioprotetores, reprodução, biotecnologia, criopreservação

## Freezing of embryos of tambaqui (*Collossoma macropomum*)

**ABSTRACT** – The protocol of embryo cryopreservation involves a complex process with various stages of implementation, as submit the embryo to cryoprotectant solution, set the cooling curve (gradual drop in temperature), the seeding, the transfer for liquid nitrogen and thawing. Such steps should be adjusted to avoid formation of ice crystals and thus avoid possible injuries. Therefore, the aim was to evaluate the steps of the process of freezing embryos of tambaqui (*C. macropomum*) testing different cooling curves in order to establish a protocol for cryopreservation. 250 embryos were used in post-gastrula stage, subjecting them to a gradual reduction in temperature of 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 and 1.25°C per minute in a cryoprotectant solution containing 17% sucrose, together with 10% methanol. The embryos were stored on pallets of 0.5 ml with the cryoprotectant solution and after two minutes of exposure were placed in a cooling unit "Biocom" when the device has stabilized at -8 ° C was held the seeding then the curve followed until -35°C and after stabilization were stored in liquid nitrogen. For each step, including the time when the embryos were immersed only to the cryoprotectant and the freezing process, the embryos were thawed and the most frequent injuries (damage to the chorion, yolk and blastoderm) were analyzed by scanning electron microscopy. The embryos immersed only in a cryoprotectant without the cryopreservation process had no injuries. The chorion absence was found in higher percentages in steps to stabilize at -35°C and after being submerged in liquid nitrogen and thawed in comparison to the time of seeding. The calf injury blastoderm spilled and damaged occurred in larger numbers to stabilize at -35°C and at thawing. The curve of freezing protocols tested did not prevent the formation of ice crystals, hence the deformation embryo, unfeasible the embryos of *C. macropomum*.

**Index terms:** cryoprotectants, breeding, biotechnology, cryopreservation

### Introdução

Ainda existem muitos problemas técnicos na congelação de embrião de peixes (Martínez - Páramo, et al., 2008; Herráez, 2009; Fornari, et al., 2011), atribuído a baixa permeabilidade das membranas embrionárias, tamanho do ovo e seus compartimentos, resultando numa baixa relação superfície/volume; tamanho das células, e a sensibilidade dos ovos a baixa

temperatura como ao próprio processo de criopreservação (Hagedorn et al., 1997; Zhang & Rawson, 1998; Salinas-Flores et al., 2008; Herráez, 2009).

O sucesso na criopreservação de embriões de peixes poderia abrir novas perspectivas no cultivo de peixes comerciais e no manejo de espécies ameaçadas de extinção contribuindo na preservação de espécies raras (Wildt, 1993); fornecer embriões de algumas espécies em determinadas estações do ano, principalmente as espécies que não desovam naturalmente e por fim possibilitaria a manutenção de estoques genéticos com grande diversidade de genes (Janik et al., 2000).

A biotecnologia da congelação consiste em manter o embrião em estado quiescente, tornando possível a conservação em nitrogênio líquido ( $N_2$ ) por tempo indeterminado, que ainda não é possível para embriões de peixe. Vários métodos eficientes de criopreservação de embriões de mamíferos se baseiam numa curva de congelação padrão desenvolvido por Willadsen et al. (1976, 1978). Esses trabalhos correlacionam a queda de temperatura em função do tempo, obtido com velocidade de,  $0,3^{\circ}C$  a  $1,5^{\circ}C$ /minuto, e a indução à cristalização da solução crioprotetora “seeding” na temperatura de  $-7^{\circ}C$  com prosseguimento da queda de temperatura até  $-33^{\circ}C$  a  $-35^{\circ}C$ , e em seguida armazenamento em  $N_2$ .

Em peixes nativos sul-americanos, vários experimentos com congelação foram realizados com o objetivo de avaliar morfológicamente as injúrias causadas na tentativa de estabelecer um protocolo, mas até agora isso não foi possível para os embriões das espécies estudada. As pesquisas apontam a formação de cristais de gelo como a causa das alterações morfológicas mais severas. Os resultados obtidos até a presente data apontam a necessidade de investigação mais detalhada em todas as etapas do processo de criopreservação (Ninhaus-Silveira et al., 2008; Fornari et al., 2010; Neves et al., prelo).

Para submeter embriões a baixas temperaturas é indispensável o uso de crioprotetores (Harvey 1983; Fornari et al., 2011; Fornari et al., 2012). Os crioprotetores são classificados de

acordo com sua ação, sendo os intracelulares: metanol, etilenoglicol e DMSO (Reichenbach et al., 2001), e os extracelulares: sacarose, glicose e trealose (Niemann, 1991; Denniston et al., 2000). Ao testar várias combinações de crioprotetores Streit Jr. et al. (2007) sugeriram um protocolo de resfriamento para *P. mesopotamicus*, utilizando 17% de sacarose associado a 9% de metanol para estocar embriões a -8°C durante seis horas.

Das espécies sul-americanas cultivadas no Brasil o *C. macropomum*, caracteriza-se como uma das principais, pelas excelentes características zootécnicas apropriadas para o cultivo, e também pela grande aceitação na piscicultura e mercado consumidor brasileiro (Urbinati & Gonsalves, 2005). É uma importante espécie na pesca profissional e amadora (Lopera-Barrero et al., 2011). Em função dessas características é alvo de pesquisas para aumento da produtividade e sugerida como modelo para desenvolvimento de biotecnologias como a criopreservação de embriões, pela importância econômica e fácil obtenção de ovos (Castanhholli et al., 1995; Lopera-Barrero et al., 2011).

O objetivo do presente experimento foi avaliar injúrias e alterações morfológicas causadas nas distintas etapas do processo de criopreservação correlacionando diferentes curvas de resfriamento em embriões de *C. macropomum* a fim de minimizar os danos celulares e estabelecer um protocolo de criopreservação.

## **Material e métodos**

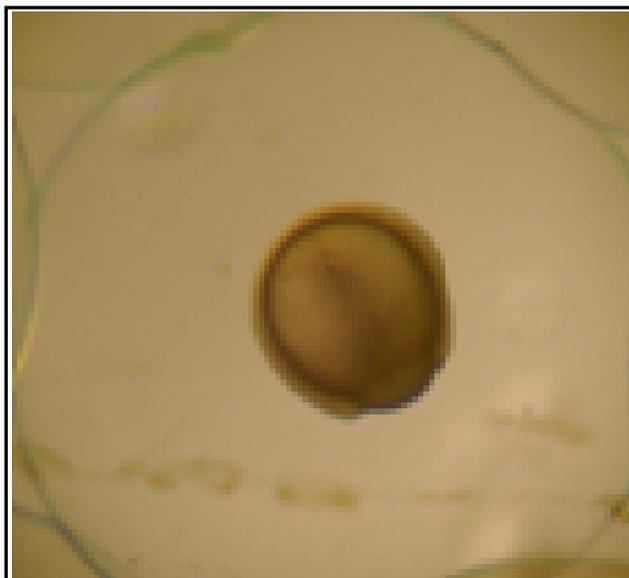
### *Animais*

De um lote em cultivo, foram selecionados 27 reprodutores capturados por uma rede de arrasto, avaliou-se as características reprodutivas mais eminentes: abdome abaulado e macio e papila urogenital saliente e avermelhada, na fêmea; e fluidez de sêmen obtido por massagem abdominal suave nos machos. Depois de selecionados foram transferidos para o laboratório e mantidos em caixas circulares de 1000 litros com renovação de água constante.

Para a desova, foi empregado o método artificial de reprodução, com a utilização de extrato hipofisário (hipófise de carpa), nas fêmeas uma dosagem de 5,5 mg/Kg, em duas vezes (10% na primeira aplicação e o restante na segunda), com intervalo de 12 horas entre as injeções, e nos machos 2,5 mg/Kg em dose única, coincidindo com a segunda dose das fêmeas. A temperatura foi aferida a cada hora após a última injeção para determinação da hora-grau, que em tambaqui para a região centro-oeste do Brasil, está em torno de 260 horas-grau.

Os gametas foram obtidos através do método convencional. Através de leve massagem pressionando no sentido encéfalo-caudal, os ovócitos foram expelidos em um recipiente seco. Em seguida o macho foi capturado e semelhantemente a fêmea, através de leve pressão no sentido encéfalo-caudal, o sêmen foi lançado diretamente sobre os ovócitos e imediatamente misturados e homogeneizados, em seguida ativados com um volume de 15% de água. Posteriormente os ovos foram colocados em incubadoras, tipo funil “Woynarovich” de 200 litros.

Para seleção dos embriões, verificou-se o fechamento do blastóporo, que ocorreu por volta de seis horas após a fecundação, com temperatura variando entre  $27,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . O processo de seleção de embriões viáveis, consistiu na observação das estruturas de desenvolvimento sem alterações e com o córion intacto (Figura 1). A seleção foi feita com auxílio de pipeta de transferência (pasteur). Após a seleção os embriões foram separados em grupos de 30, para serem submetidos aos tratamentos.



**Figura 1.** Imagem de embrião de *Collossoma macropomum*, no estágio de pós-gastrulação, 95% de epibolia (fechamento do blastóporo), obtida em esteriomicroscópio 2,5X.

#### *Congelação dos embriões de tambaqui*

As curvas de resfriamento bem como todo o processo de congelação foram baseadas no modelo descrito por Schneider & Mazur (1984) para embriões de bovinos. A solução crioprotetora utilizada (17% de sacarose associada a 10% de metanol) seguiu o protocolo de resfriamento para embriões de *Piaractus mesopotamicus* sugerido por Streit Jr. et al. (2007).

Depois de selecionados os 250 embriões viáveis de tambaqui, os mesmos foram submetidos a diferentes curvas de resfriamento (0,25, 0,50, 0,75, 1,00 e 1,25°C por minuto). Para cada tratamento foram utilizados 50 embriões, divididos em cinco repetições. Portanto foram alocados 10 embriões em cada palhete de 0,5ml, sendo cinco palhetes para cada tratamento, e submetidos à curva de congelação através de um aparelho de congelação “Biocom” (Dominium K), que permitiu regular as curvas de temperatura de forma automática e gradual. Para todas as curvas testadas no momento em que estabilizou em -7°C, efetuou-se o “seeding” (indução a cristalização), posteriormente a curva de temperatura seguiu diminuindo até atingir -33°C, após, seis minutos de estabilização, os embriões foram estocados em botijão de N<sub>2</sub> líquido por três dias.

Após o período de armazenamento os embriões foram retirados do nitrogênio líquido e descongelados. Para o descongelamento, utilizou-se o método procedido nos trabalhos de resfriamento de embriões de peixes (Streit Jr. et al., 2007; Fornari et al., 2011; Fornari et al., 2012), Após dois minutos em temperatura ambiente foram mergulhados diretamente na incubadora a temperatura ambiente, e acompanhando o desenvolvimento embrionário até as possíveis eclosões.

As injúrias no córion, vitelo e blastoderme do embrião, causadas durante o processo de criopreservação foram avaliadas em quatro etapas: quando os embriões foram apenas submergidos na solução crioprotetora; no momento do “seeding”; na estabilização a - 35°C e no descongelamento após serem armazenados em nitrogênio líquido. As amostras de cada repetição foram coletadas aleatoriamente e fixadas em glutaraldeído 2% com tampão fosfato 0,2M. Posteriormente foram eletromicrografados através da microscopia eletrônica de varredura.

#### *Microscopia eletrônica de varredura*

As amostras fixadas foram desidratadas em álcool e posteriormente submetidas à secagem através de um aparelho Ponto Crítico. Para desidratação os embriões foram submetidos a uma série crescente de concentração de álcool, 30, 50, 70% por 30 minutos para cada concentração e um banho com 90% de álcool durante 15 min. E novamente a 90% por mais 15 min. por final mais dois banhos de 15 min. com álcool 100% (etanol).

Para secagem foi utilizado um aparelho de Ponto Crítico (BAL-TEC CDP 030, critical point Dryer), que combina CO<sub>2</sub> líquido e gasoso. Em seguida foram metalizados em uma base metálica “Stubs”, com ouro-paládio em um aparelho Metalizador Desk II Denton vacunn.

O material foi examinado e eletromicrografado em microscópio eletrônico de varredura JEOL (JSM-5410) no setor de microscopia da UEM, Maringá-PR.

*Para avaliação da taxa de eclosão e taxa de fecundação, procedeu-se da seguinte forma:*

Taxa de fecundação: após o fechamento do blastóporo (seis horas após a fecundação), no momento da seleção dos embriões viáveis, foi determinada a taxa de fecundação, contando embriões viáveis e ovos gorados, de três porções tomadas aleatoriamente nas incubadoras.

Taxa de eclosão controle: No momento da seleção dos embriões três repetições com 100 embriões foram transferidos diretamente para as incubadoras, sem serem submetidas a crioprotetores, quando se verificou a eclosão das larvas, estas foram contadas determinando a taxa de eclosão controle, apenas para certificar a qualidade dos embriões selecionados.

#### *Análise estatística*

Para avaliar o processo de criopreservação referente a probabilidade de ocorrência de injúrias durante o processo de criopreservação utilizando o teste de comparação múltiplas de médias, teste t. Estas análises foram realizadas utilizando o PROC genmod do SAS versão 9.0, considerando a distribuição binomial com função logit.

### **Resultado e discussão**

#### *Qualidade dos embriões e taxa de eclosão*

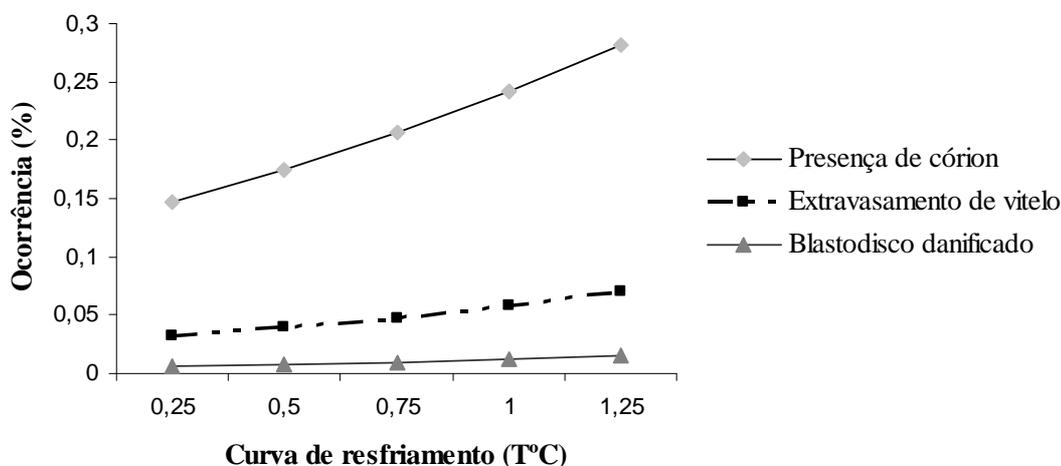
A taxa de fecundação dos ovócitos utilizados no presente experimento se caracterizou como boa fertilização,  $76,60 \pm 4,2\%$ . A qualidade do ovo utilizado na criopreservação é importante estando relacionado à resistência quando submetidos a baixas temperaturas (Lahnsteiner, 2008) e a garantia de não haver influência da qualidade do embrião na taxa de eclosão. A taxa de eclosão controle (sem criopreservação), no presente experimento foi de  $79,50 \pm 3,71$ . Os tratamentos empregados podem ser comparados com a taxa de eclosão controle para certificação do efeito dos tratamentos. No entanto, após a descongelação dos embriões de *C. macropomum*, não foi observado eclosão em nenhum dos tratamentos, embora, tenha sido observada hidratação e boa conformação em alguns embriões.

No momento da descongelação ainda dentro dos palhetes alguns embriões apresentavam coloração esbranquiçada, como foi feita por Fornari et al. (2010) e Neves et al. (prelo) nos

testes de congelação com embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e por Ninhaus-Silveira et al. (2008) em embriões de *Prochilodus lineatus*. Segundo Zhang & Rawson (1996) o aspecto esbranquiçado após a descongelação está relacionado a formação de cristais de gelo. Porém, alguns embriões se apresentavam com coloração translúcida no momento da descongelação ainda no palhete e aparentemente boa conformação, mas, após uma hora na incubadora todos os embriões tornaram esbranquiçados e não evoluíram.

### *Curvas de resfriamento*

Apesar de não ocorrer eclosão de larvas de tambaqui após os testes em diferentes curvas de resfriamento, percebe-se que quanto mais rápida a queda de temperatura maior foi a ocorrência de embriões com córion (Figura 2).



**Figura 2.** Probabilidade (%) de preservação de córion e ocorrência de injúrias (extravasamento de vitelo e blastoderme danificado) em embriões de *Collossoma macropomum* submetidos às curvas de resfriamento.

Estudos com resfriamento a  $-8^{\circ}\text{C}$  realizado por Streit Jr. et al. (2007) e Fornari et al. (2012) com embriões de pacu (*P. mesopotamicus*) e Fornari et al. (2011) com embriões de cascudo preto (*Rhinelepis aspera*), sugeriram novos estudos para determinar a curva de resfriamento tais resultados somados aos obtidos por Lopes et al. (2012), mostrou que há uma

correlação entre a eficiência do processo de congelação com a curva de resfriamento. No presente estudo com embriões de tambaqui, as rampas de resfriamento com mais velocidade de queda possibilitaram a preservação da maior porcentagem de embriões com córion, o que apontam a velocidade de queda de temperatura como um dos fatores que afetam a eficiência dessa biotecnologia, sugerindo mais pesquisas com rampas de resfriamento.

A avaliação do processo em diferentes etapas da criopreservação de embriões de tambaqui permitiu apontar os índices de ocorrência de injúrias A estabilizar em  $-7^{\circ}\text{C}$  e induzir a cristalização “seeding” o córion ainda se encontrava preservado em comparação as outras etapas ( $p < 0,05$ ) que raramente mostraram embriões com córion. Comparando as injúrias mais severas, os maiores percentuais incidiram ao estabilizar a curva em  $-35^{\circ}\text{C}$  e no descongelamento após ser criopreservado em nitrogênio líquido (Tabela 1).

**Tabela 1.** Probabilidade (%) da presença de córion (PC) e das injúrias, vitelo extravasado (VE) e blastoderme danificado (BD) nas diferentes etapas do processo de congelação dos embriões de tambaqui (*Collossoma macropomum*).

Etapas da congelação	PC	**	VE	**	BD	*
Seeding ( $-7^{\circ}\text{C}$ )	21	a	21	B	56	b
- $35^{\circ}\text{C}$	02	b	41	A	55	b
- $196^{\circ}\text{C}$	02	b	33	A	63	a

Diferença estatística (\* $p < 0,1$  e \*\* $p < 0,05$ ) representado por letras na coluna

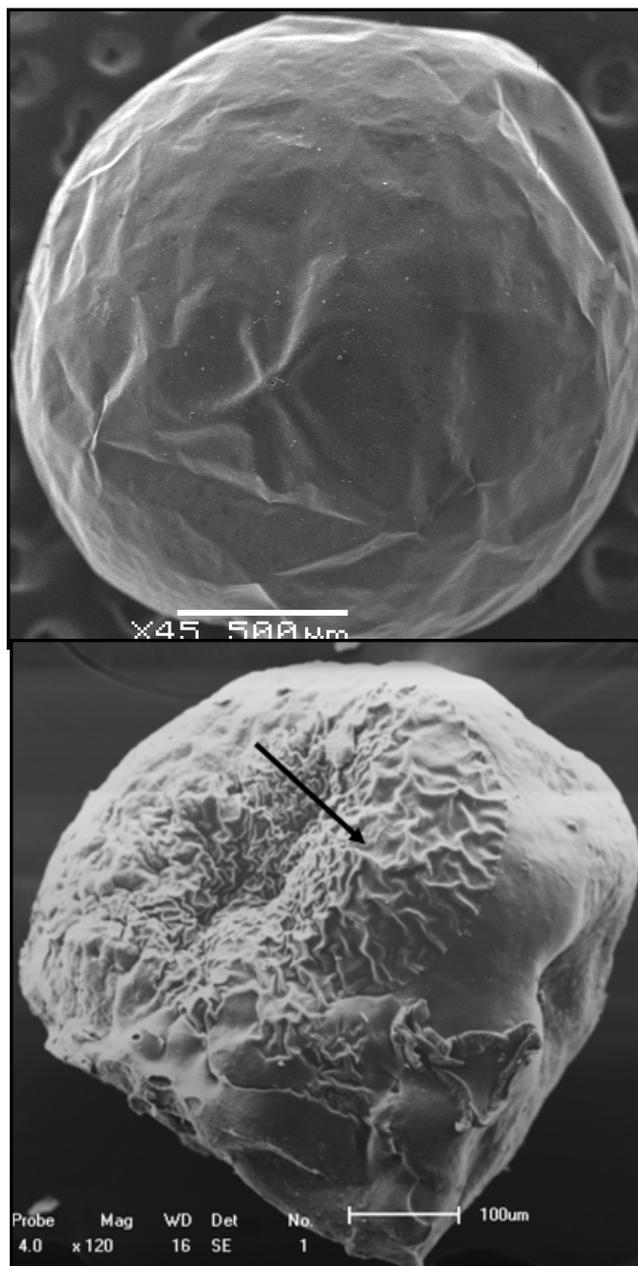
A indução a cristalização “seeding” segundo Leibo (1984) e Palasz & Mapletoft (1996) é extremamente importante, promovendo a solidificação do meio extracelular antecedendo a congelação do meio contendo os embriões, o que, proporciona as condições necessárias para uma retirada lenta de água do meio intracelular através da formação de gelo no espaço extracelular, indicando que as estruturas internas dos embriões de tambaqui no presente experimento ainda não estavam congeladas no momento do “seeding”, o que certamente influenciou em uma menor ocorrência de injúrias, para esse momento do processo. Por outro lado, os maiores índices de injúrias nos embriões em temperaturas no ponto com que se tornam vítreo ( $-35^{\circ}\text{C}$ ), podem estar relacionados à desidratação incompleta, levando à

formação de cristais de gelo. Os danos causados aos tecidos durante os processos de criopreservação e aquecimento são em virtude, principalmente a: formação de cristais de gelo intracelulares, que afetam a estrutura da célula; concentração de soluto resultante do processo de desidratação que ocorre durante a congelação tanto no meio extra como intracelular e a interação entre esses dois fatores (Pickett, 1986). Outro ponto a ser considerado é que após a descongelação, a remoção do crioprotetor do interior da célula deve ser realizada de forma lenta, através da diluição desses, uma vez que a reentrada brusca de água no meio intracelular também leva à lise das membranas (Landim-Alvarenga, 1995).

#### *Alterações morfológicas e injúrias*

##### *Córion*

O córion ficou preservado em todos os embriões quando foi submetido ao crioprotetor. Também foi observado com menor porcentagem a presença de córion (Figura 3) após estabilizar em  $-7^{\circ}\text{C}$  e se procedeu o “seeding”, ao estabilizar em  $-35^{\circ}\text{C}$ . O descongelamento o córion apresentou irregular, rompido, não sendo encontrando íntegro em nenhum dos embriões (Figuras 4).

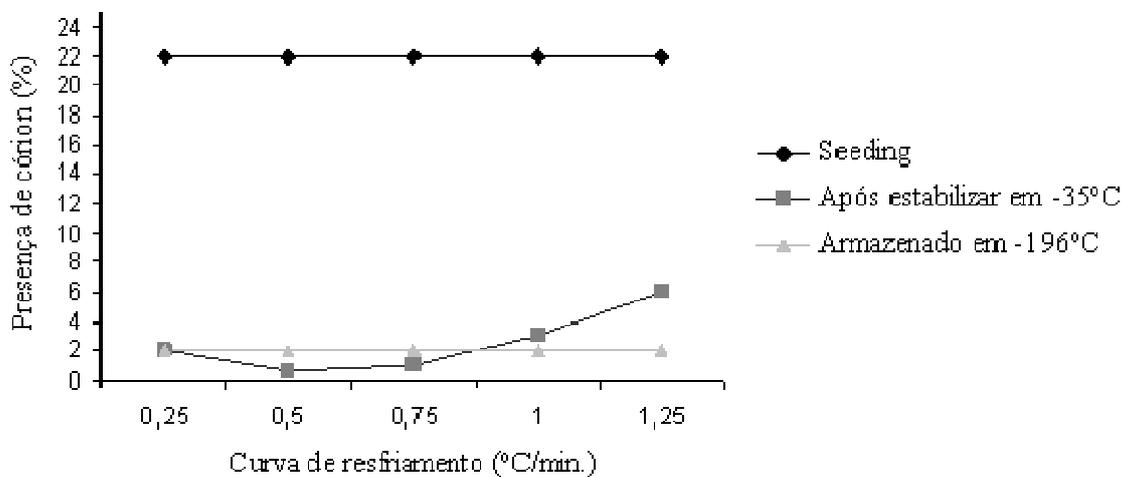


**Figura 3.** Imagem de microscopia de varredura mostrando o córion intacto do embrião de tambaqui (*Colossoma macropomum*).

**Figura 4.** Imagem de microscopia de varredura mostrando o córion danificado de embrião de tambaqui (*Colossoma macropomum*) após o processo de criopreservação.

Durante o processo de criopreservação, pode-se verificar a maior ocorrência de córion intacto após o “seeding”. Na medida em que a temperatura baixou ( $-35^{\circ}\text{C}$ ) a ocorrência de córion preservado foi quase nulo. Outro ponto que chama atenção é referente à curva de resfriamento. Quanto mais rápida a queda de temperatura, maior a probabilidade de ocorrência de córion intacto, sugerindo o efeito da correlação entre a eficiência do

crioprotetor e rampa de resfriamento (Figura 5). A mesma observação foi feita por Rawson & Zhang (2005).



**Figura 5.** Probabilidade (%) de preservação do córion de embriões de *Colossoma macropomum* durante as etapas do processo de criopreservação em diferentes curvas de resfriamento.

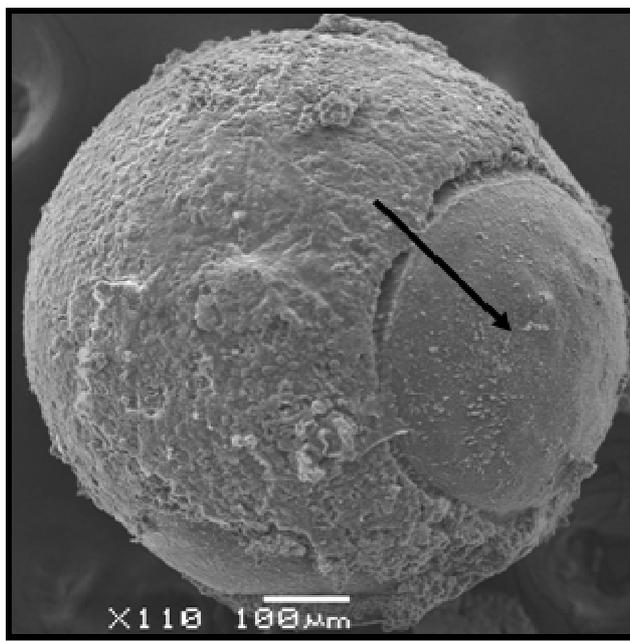
Embriões com córion danificado depois da criopreservação também foi relatado por Fornari et al., (2010). Após descongelar embriões de pacu (*P. mesopotamicus*), os autores relataram graves deformações em toda a estrutura do embrião, nos microsporos, blastoderme e vitelo, bem como córion destruído na maioria dos embriões. O córion é uma membrana externa com função de proteger o embrião (Ninhaus-Silveira et al., 2007), e é constituído por bicamadas fosfolipídicas formando um mosaico fluido (Luzardo et al., 2000). A ocorrência de lesões nas células de embriões criopreservados geralmente está relacionada, às transições de faixa de temperatura que danificou as membranas celulares (Leibo, 2000; Valdez et al., 2005). Os lipídios das membranas celulares “forçam” uma transição de fase líquido para uma fase tipo “gel” no intervalo de temperaturas que variam de 0°C e -20°C (Zeron et al., 1999). Provavelmente a preservação de córion no momento do “seeding” estaria relacionado a temperatura (-7°C) e conseqüentemente a menor probabilidade de formação de cristais de gelo intracelular (Hagedorn et al., 2004; Rawson & Zhang, 2005).

*Vitelo*

Da mesma forma, verificou-se vitelo intacto nos embriões submetidos ao crioprotetor ao estabilizar em  $-7^{\circ}\text{C}$  (Figura 6). Nas demais etapas o vitelo se apresentou como uma massa celular amorfa, e tendo em vista que os grânulos não se apresentavam de maneira individualizada seu conteúdo extravasou (Figura 7). Algumas hipóteses podem ser sugeridas para ocorrência das lesões nas membranas celulares incluindo a que protege o vitelo, como a sensibilidade das células embrionárias quando expostas a baixa temperatura, pela penetração insuficiente dos crioprotetores intracelulares ou pelo tempo insuficiente de permeação e ainda pela toxidez da solução crioprotetora utilizada (Rawson & Zhang, 2005; Neves et al., prelo).

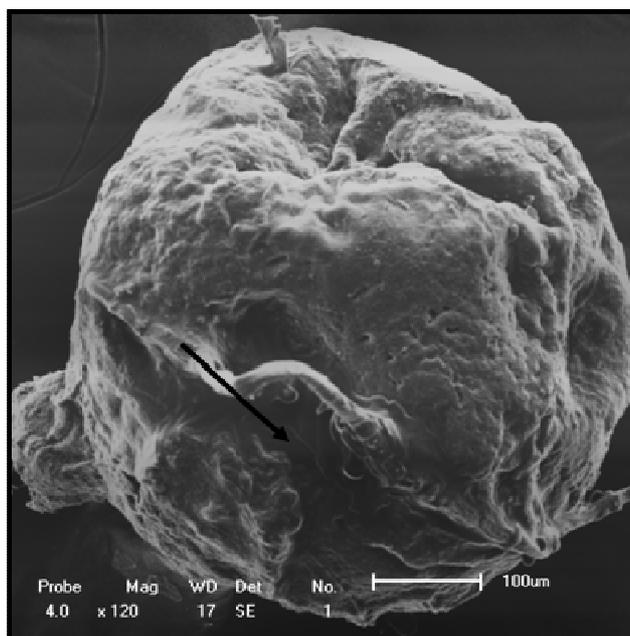
Os resultados encontrados no presente estudo são divergentes dos obtidos por Hagedorn et al. (1998) para embriões de *Brachydanio rerio*. Os autores observaram que o vitelo manteve íntegro morfologicamente, com membranas intactas e conteúdo aparentemente normal após exposição às soluções crioprotetoras, DMSO e propilenoglicol e submetidos posteriormente a congelação. Ressaltaram ainda que o dano causado pela baixa temperatura dentro do vitelo pode ser tolerado.

Em estudos com embriões peixe zebra Hagedorn et al. (1998) identificaram a existência e a localização da barreira de permeabilidade para os crioprotetores DMSO e propilenoglicol. Os autores quantificaram parâmetros de permeabilidade da água e do soluto para o vitelo e para o blastoderme, através da mudança volumétrica da entrada do crioprotetor com auxílio de microscópio ótico e também pelo espectroscópio de ressonância magnética nuclear. Estes



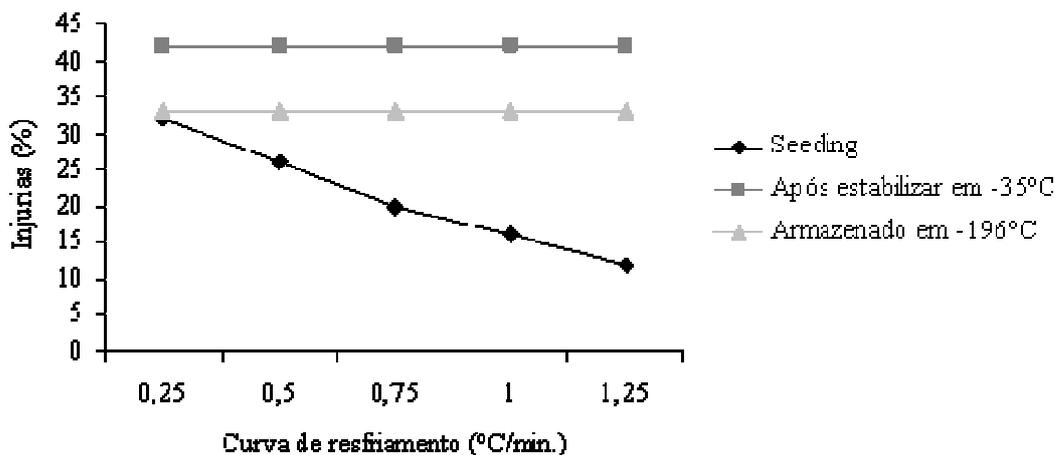
autores conseguiram prever que o principal local de dano ao crioprotetor poderia ocorrer dentro do compartimento do vitelo. Assim, sem uma crioproteção eficiente dentro do vitelo, ocorre a formação de cristais de gelo, danificando o embrião. O fato reportado pode ser aplicado no presente estudo explicando o dano causado nos embriões de *C. macropomum* após a exposição às soluções crioprotetoras e a congelação.

**Figura 6.** Imagem de microscopia de varredura mostrando o vitelo do embrião de tambaqui (*Colossoma macropomum*) após o processo de criopreservação.



**Figura 7.** Imagem de microscopia de varredura mostrando injúrias no vitelo do embrião de tambaqui (*Colossoma macropomum*) após o processo de criopreservação.

A correlação entre o momento do “seeding” e a curva de resfriamento, demonstra existir um efeito positivo com o aumento da queda de temperatura ( $^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ ) e a ocorrência de injúrias no vitelo após criopreservação (Figura 8). Este fato pode estar relacionado a rampa de resfriamento utilizada no presente experimento, considerando que quedas mais bruscas de temperaturas podem atingir o ponto de solidificação mais rapidamente pelo aumento extremo da viscosidade, chegando mais diretamente a fase vítrea (Massip, 2001; Yavin & Arav, 2007), consequentemente menor ocorrência de injúrias, como também foi relatado em embriões de bovinos (Dalcin & Lucci, 2010).

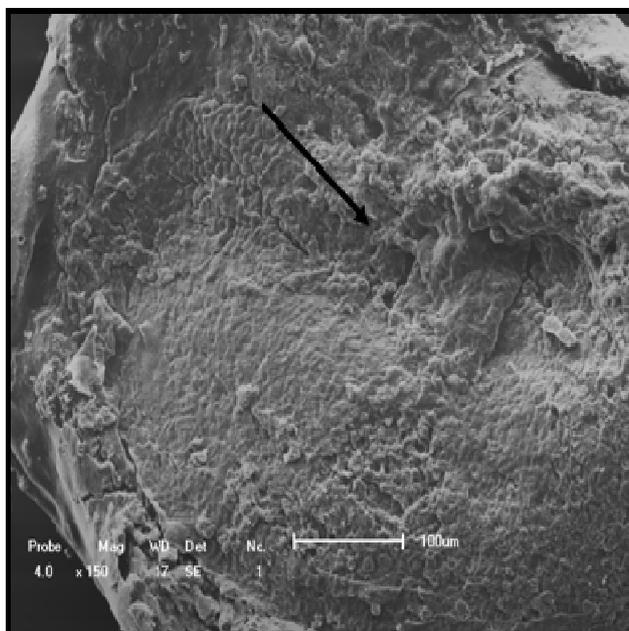


**Figura 8.** Probabilidade (%) de extravasamento de vitelo em embriões de *C. macropomum* durante as etapas do processo de criopreservação em diferentes curvas de resfriamento.

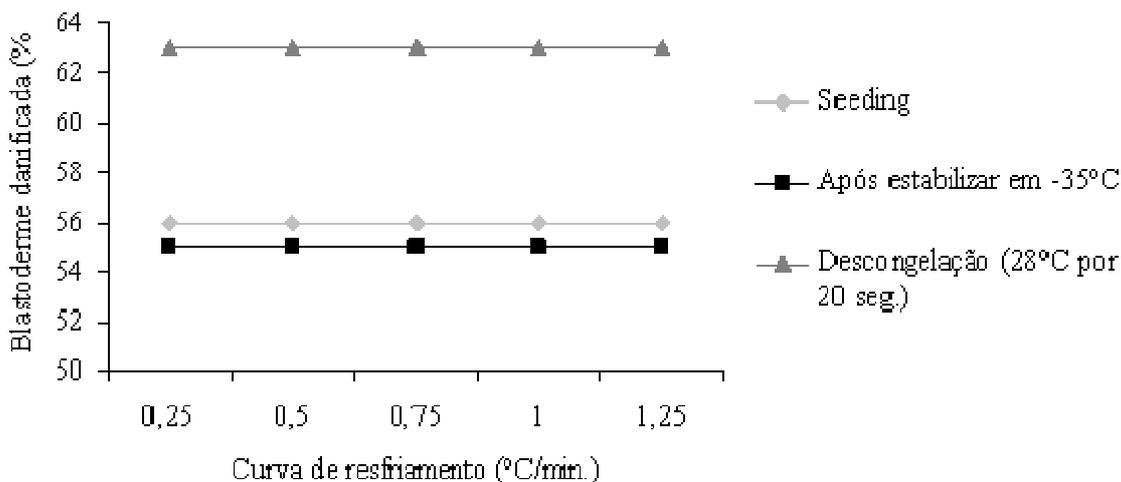
#### *Blastoderme*

Exceto os embriões submetidos ao crioprotetor, todos os outros apresentaram injúrias nas células (Figura 9), com maior ocorrência de dano após a criopreservação completa (armazenado em nitrogênio líquido) e descongelamento, no “seeding” e ao estabilizar em -35°C as injúrias aconteceram em menores proporções (Figura 10). Do mesmo modo, Hagedorn et al. (1998) analisando exemplares de embriões de “zebrafish”, também verificaram a blastoderme destruída, sugerindo que essas alterações ocorreram pela entrada insuficiente de crioprotetor nas células e consequente formação de cristais de gelo já que a temperatura intraembrião de formação do gelo é de -20 a -30°C (Hagedorn et al., 2004).

O blastoderme é a camada de célula (blastômeros) que recobre o vitelo e é formado por células de distintas complexidades (Ninhaus-Silveira et al., 2008; Neves et al., prelo), portanto, não só a ação do frio como também os danos osmóticos provocam injúrias nas células do blastoderme (Zhang et al., 1993; Zhang & Rawson, 1996), e existe uma estreita correlação entre tempo de exposição - crioprotetor - penetração. No presente estudo, há indicativo de que não houve penetração do crioprotetor ou que a concentração e tempo de exposição não foram suficientes para proteger o embrião contra os efeitos negativos do processo de congelamento e descongelamento.



**Figura 9.** Imagem de microscopia de varredura mostrando injúrias no blastoderme de embrião de tambaqui (*Colossoma macropomum*) após o processo de criopreservação.



**Figura 10.** Probabilidade (%) de injúrias no blastoderme de embriões de *Colossoma macropomum* durante as etapas do processo de criopreservação em diferentes curvas de resfriamento.

De acordo com Zeron et al. (1999) e Ahammad et al. (2003) altas concentrações de crioprotetor relacionado ao tempo de exposição pode provocar ruptura de membranas celulares, provavelmente em função do desequilíbrio osmótico. Segundo Billard & Zhang (2000), a criopreservação de ovos e embriões de peixes tem apresentado vários problemas associados com as injúrias causadas durante os processos de congelamento e descongelamento e quatro características são identificadas como possíveis responsáveis pelo insucesso. 1 - a maioria dos ovos de peixes são maiores que 1mm de diâmetro, resultando em uma baixa relação área por volume e tendo como consequência a redução da taxa de fluxo de água e dos crioprotetores durante os passos para criopreservação; 2- a grande quantidade de vitelo e as diferentes características osmóticas dos vários compartimentos do embrião; 3 - o complexo sistema de membrana dos ovos de peixes, que possuem baixa permeabilidade; 4 - e a alta sensibilidade ao frio (Ahammad et al., 1998; Liu et al., 2001).

Muito embora, os protocolos de curva de congelamento testados não evitaram a formação de cristais de gelo e conseqüentemente a deformação embrionária, inviabilizando os embriões

de *C. macropomum*, alguns pontos sobre a criopreservação de embriões de tambaqui puderam ser avaliados sugerindo novas pesquisas.

Portanto, à medida que se avança no conhecimento sobre princípios e técnicas criobiológicas, será possível a identificação de pontos cruciais para o desenvolvimento de métodos que provoquem menores crioinjúrias, tornando-as totalmente reversíveis ou até mesmo nulas ao desenvolvimento embrionário subsequente.

### Referência

- 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**, San Diego, v.37, n.4, p.318-324, 1998.
- AHAMMAD, M.M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B.B. Hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryo stored at 4 and  $-2^{\circ}\text{C}$  in different concentration of methanol and sucrose. **Theriogenology**, Stoneham, v.60, n.8, p.1409-1422, 2003.
- BILLARD R.; ZHANG, T. Techniques of genetic resource banking in fish. In: Cryobanking the genetic resource. **Wildlife conservation for the future?**. ed Taylor & Francis. London, 2000. 145-170.
- CASTANHOLLI, N.; ZUIM, S.M.F. Consolidação do conhecimento adquirido sobre o pacu, *Colossoma mitrei* – Berg. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v.5, n.1, p.1-2, 1995.
- DALCIN, L.; LUCCI, C.M. E.A. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.34, n.3, p.149-159, 2010.
- DENNISTON, R.; MICHELET, S.; GODKE, R.A. Principles of cryopreservation. In. TIERSCH, T.R. e MAZIK, P.M. Cryopreservation in aquatic species. **World Aquaculture Society**: Baton Rouge. 2000, cap.2, p.59-74
- FORNARI, D.C.; RIBEIRO, R.P.; STREIT JR., D.P., VARGAS, L., GODOY, L., OLIVEIRA, C.A.L., DIGMAYER, M., GALO, J.M., NEVES, P.R. Increasing storage capability of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos by chilling: development of a useful methodology for hatcheries management. **CryoLettrs**, Lewes, v. 33, n. 2, p. 125-133, 2012.
- FORNARI, D.C.; RIBEIRO, R.P.; STREIT JR., D.P.; VARGAS, L.; MORAES, G.V.; GODOY, L.; OLIVEIRA, D. Effect of cryoprotectants on the survival of cascudo preto (*Rhinelepis aspera*) embryos stored at  $-8^{\circ}\text{C}$ . **Zygote**, Cambridge, v.18 n.1, p.1-6, 2011.
- FORNARI, D.C.; RIBEIRO, R.P.; STREIT JR., D.P.; VARGAS, L.; MORAES, V.G. Freezing injuries in the embryos of *Piaractus mesopotamicus*. **Zygote**, Cambridge, n.19, v.2, p. 345-350, 2010.

- HAGEDORN, M.; HSU, E.; KLEINHANS, F.W.; WILDT, D.E. New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation. **Cryobiology**, San Diego, v.34, n.4, p.335-347, 1997.
- HAGEDORN, M.; KLEINHANS, F.W.; ARTMOV, D.; PILATUS, U. Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo. **Biology of Reproduction**. Amsterdam, v.59, p.1240-1250, 1998.
- HAGEDORN, M.; PETERSON, A.; MAZUR, P.; KLEINHANS, F.W. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option. **Cryobiology**, San Diego, v.49, n.2, p.181-189, 2004.
- HARVEY, B. Cooling of embryonic cells, isolated blastoderms, and intact embryos of the zebra fish *Brachydanio rerio* to minus -196 Celsius. **Cryobiology**, San Diego, v.20, n.5, p.440-447, 1983.
- HERRÁEZ, M. P. Criopreservación de gametas y embriones. In: Carrillo-Estévez, M. A. (Eds.). **La reproducción de los peces: Aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura**. Madrid: Fundación Observatorio Español de Acuicultura. 2009, p.477-530.
- JANIK, M.; KLEINHANS, F.W.; HAGEDORN, M. Overcoming a permeability by microinjecting cryoprotectants into zebrafish embryo (*Brachidanio rerio*). **Cryobiology**, San Diego, v.41, p.25-34, 2000.
- LAHNSTEINER F. The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Dario rerio*) embryo. **Theriogenology**, Stoneham, v.69, n.2, p.384-396, 2008.
- LANDIM-ALVARENGA, FC. Avaliação dos efeitos do congelamento e descongelamento sobre a viabilidade e morfologia de embriões equinos. 1995. 102f. **Tese (Doutorado)** - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 1995.
- LEIBO, S.P. A one-step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**. Stoneham, v. 21, p. 767-790, 1984.
- LEIBO, S.P. Sources of variation in cryopreservation. In: TIERSCH, T.R; MAZIK, P.M. **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society. 2000, cap.2, p.75-83.
- LIU, X.H.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Effects of cooling and partial removal of yolk a the chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, Amsterdam, v.55, n.8, p.1719-1731, 2001.
- LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; VARGAS, L.; POVH, J.A. PAIRRA, A. As principais espécies produzidas no Brasil. In. LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; MENDEZ, L.D.V.; POVEDA-PRRA, A.R. (Eds.). **Produção de organismos aquáticos: uma visão geral no Brasil e no mundo**. Guaíba: Agrolivros. 2011, p.143-215.
- LOPES, T.; STREIT JR., D.P.; FORNARI, D.C.; OLIVEIRA, D.; RIBEIRO, R.P.; ROMAGOSA, E. Chilling curves for *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) embryos stored at -8°C. **Zygote**, Cambridge, p. 1-6, 2012.
- LUZARDO, C.M.; AMALFA, F.; NUÑEZ, A.M.; DÍAZ, S.; BIONI, A.C.; DISALVO, E.A. Effect of Trehalose and Sucrose on the Hydration and Dipole Potential of Lipid Bilayers. **Biophysical Journal**. Philadelphia, v.78, n.5, p.2452-2458, 2000.

- MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; PÉREZ-CEREZALES, S.; BOBLES, V.; ANEL, L.; HERRÁEZ, M.P. Studies Incorporation of antifreeze proteins into zebrafish embryos by a non-invasive method. **Cryobiology**, San Diego, v.56, n.3, p.216-222, 2008.
- MASSIP, A. Cryopreservation of embryos of farm animals. **Reproduction Domestic Animals. Barcelona**, v.36, n.2, p.49-55, 2001.
- NEVES, P.R.; RIBEIRO, R.P.; STREIT JR., D.P.; NATALI, M.R.M.; FORNARI, D.C.; SANTOS, I.; GODOY, L. Injuries in pacu embryos (*Piaractus mesopotamicus*) after freezing and thawing. **Zygote**, Cambridge (Prelo).
- NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, Stoneham, v.35, n.1, p.109-124, 1991.
- NINHAUS-SILVEIRA, A. FORESTI, F.; AZEVEDO, A.; AGOSTINHO, C.A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Cryogenic preservation of embryos of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote**, Cambridge., v.16, n.2, p.1-11. 2008.
- NINHAUS-SILVEIRA, A; FORESTI, F.; AZEVEDO, A.; AGOSTINHO, C.A. Structural and ultrastructural characteristics of the yolk syncytial layer in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Teleostei; Prochilodontidae). **Zygote**, Cambridge, v.16, n.2, p. 267–271. 2007.
- PALASZ, A.T., MAPLETOFT, R.J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. **Biotechnology**. Stoneham., v.14, p. 127-149, 1996.
- PICKETT, J. A. (1986). Biotechnology in the service of pest control. In: **Biotechnology's potential for increasing crop production efficiency**. National Agricultural Conference, Stoneleigh, 1986.
- RAWSON, D.M.; ZHANG, T. New approaches to the cryopreservation of fish oocytes and embryos. **The Role of Biotechnology**, Villa Gualino, Turin, Italy – 5-7 March, 2005.
- REICHENBACH, H.D.; OLIVEIRA, L.; LIMA, P.F.; SANTOS-FILHO, A.S.; ANDRADE, J.C.O. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: GONSALVES P. B.; FIGUEIREDO J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas: aplicação à reprodução animal**. Ed Varela, São Paulo-SP. cap. 8, 2001. p.127-178.
- SALINAS-FLORES, L.; ADAMS, S.L.; LIM, M.H. Determination of the membrane permeability characteristics of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, oocytes and development of optimized methods to add and remove ethylene glycol. **Cryobiology**, San Diego. v.56, 43-52, 2008.
- SCHNEIDER V. MAZUR P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v.21, n.1, p.68-79, 1984.
- STREIT Jr., D.P.; DIGMAYER, M.; RIBEIRO, R.P.; SIROL, R.N.; MORAES, G.V.; GALO, J.M. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília v.42, n.2, p.1199-1202. 2007
- URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTO, B. GOMES, L.C. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005. p. 225-246.

- VALDEZ Jr., M.; MIYAMOTO, A.; HARA, T.; EDASHIGE, K.; KASAI, M. Sensitivity to chilling of medaka (*Oryzias latipes*) embryos at various developmental stages. **Theriogenology**, Stoneham, v.64, n.3, p.102-122, 2005.
- WILDT, D.E.; SEAL, U.S.; RALL, W.F. Genetic resource banks and reproductive technology for wildlife conservation. **In: Genetic conservation of salmonid fish (J.G. Cloud and G.H. Thorgaard, Eds)**, Stoneham, p.159-173, 1993.
- WILLADSEN S.M., POLGE, C., ROWSON, L.E.A. Deep-Freezing of sheep embryos. **Journal of Reproduction and fertility**, Cambridge, v.46, n.1, p.151-154, 1976.
- WILLADSEN S.M., POLGE, C., ROWSON, L.E.A. The viability of deep frozen cow embryos. **Journal of Reproduction and fertility**, Cambridge, v.46, n.2, p.391-393, 1978.
- YAVIN, S; ARAV, A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. **Theriogenology**. Stoneham, v.67, n.3, p.81-89, 2007.
- ZERON, Y.; PEARL, M.; BOROCHOV, A.; ARAV, A. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. **Cryobiology**, San Diego. v.38, n.4, p.35-42, 1999.
- ZHANG, T.; RAWSON, D.M. Permeability of the vitelline membrane of 1-cell and 6-somite stage zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos to water and methanol. **Cryobiology**, San Diego, v.37, n.4, p.13-21, 1998.
- ZHANG, T.; RAWSON, D.M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryo. **Cryobiology**, San Diego, v.33, n.3, p.1-13, 1996.
- ZHANG, T.; RAWSON, D.M.; MORRIS, G.J. Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Aquatic Living Resources**, San Diego, v.6, p.145-153, 1993.

## VI. Solução crioprotetora para vitrificação de embriões de tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Darci Carlos Fornari<sup>1\*</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Zootecnia, Av. Colombo, 5790 - Bloco J45, CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. E-mail: [darci.peixegen@gmail.com](mailto:darci.peixegen@gmail.com)

\**Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)*

**Resumo:** O objetivo foi avaliar o processo de vitrificação em embriões de tambaqui (*Colossoma macropomum*) indicando o crioprotetor mais eficiente quanto à toxidez e as injúrias causada pelo processo. Selecionou-se 480 embriões de tambaqui na fase de gastrulação (90% de epibolia). Para avaliar o processo de vitrificação, foi dividido-se o experimento em duas etapas. Primeiro, avaliou-se a toxidez dos crioprotetores; metanol, dimetil-sulfóxido (DMSO), etilenoglicol e glicerol nas concentrações de 10, 20, 30% em três tempos de exposição 1, 2 e 3 minutos. Em segunda etapa, avaliou-se o processo de vitrificação para todos os tratamentos. Para tanto os embriões foram submetidos as soluções crioprotetora, guardados em palhetes de 0,5 ml e imediatamente mergulhados em nitrogênio líquido. Após a descongelação, avaliou-se a taxa de eclosão e as injúrias mais recorrentes causadas aos embriões pelo processo de vitrificação, através de imagens de microscopia eletrônica de varredura. Embora, a toxidez do DMSO e glicerol aos embriões de *C. macropomum* na concentração de 10% tenham ocorrido em menores porcentagens, nas concentrações de 20 e 30% incluindo o etilenoglicol foram mais tóxicos, não sendo, portanto, interessante para o processo de vitrificação. O metanol foi menos tóxico em todas as concentrações, sendo sugerido para os testes de vitrificação. Nos embriões vitrificados apesar de não ocorrer eclosão, pode-se observar a preservação do córion e de inúmeras estruturais celulares, principalmente para o metanol.

**Palavras-chave:** aquicultura, biotecnologia, criopreservação, peixe, reprodução.

### Cryoprotectants for vitrification of embryos of tambaqui (*Colossoma macropomum*)

**Abstract:** The objective was to evaluate the process of vitrification of embryos of tambaqui (*Colossoma macropomum*), indicating the most efficient as the cryoprotectant toxicity and the injuries caused by the process. 480 tambaqui embryos were selected in the phase of gastrulation (90% epibolia). To evaluate the process of vitrifying the experiment was divided into two steps, first evaluated the toxicity of the cryoprotectants, methanol, dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol and glycerol in concentrations of 10, 20, 30% in three days of

exposure 1, 2 and 3 minutes, in a second step were evaluated the vitrification process in all treatments. For both embryos were submitted to cryoprotectant solutions, palhetes of 0.5 ml and immediately immersed in liquid nitrogen. After thawing, we evaluated the hatching rate and the most frequent injuries caused to embryos by vitrification process, using images from scanning electron microscopy. Although the toxicity of DMSO and glycerol in embryos of *C. macropomum* in the concentration of 10% occurred in smaller percentages, in concentrations of 20 and 30% including ethylene glycol were more toxic and are not therefore interesting for vitrification process. The methanol was less toxic in all the concentrations, and suggested to be tested to vitrification. In vitrified embryos although did not occur hatch it was observed the chorion and preservation of many structural cell preservation, especially for methanol.

**Key world:** aquaculture, biotechnology, cryopreservation, fish, reproduction.

### Introdução

A criopreservação de embriões de peixes ainda não é uma biotecnologia dominada, porém alguns avanços foram conquistados (Ninhaus-Silveira et al., 2008; Fornari et al., 2012). Inúmeros benefícios ecológicos e de produção são relacionados por pesquisadores (Hagedorn & Kleinhans, 2000; Herráez, 2009; Fornari et al., 2010) a partir do domínio desta técnica, como: conservação de material genético de espécies ameaçadas de extinção; possibilidade de armazenar uma gama variada de material genético de um laboratório de reprodução, evitando assim a consanguinidade; redução na pressão sobre reprodutores de populações selvagens; aplicação de logística na produção de alevinos, como no caso de espécies reofílicas que se reproduzem apenas em um período no ano; redução no número de reprodutores mantidos em centros de produção de alevinos e, por consequência redução na locação de tanques de estocagens de reprodutores.

Para que embriões de peixes possam vir a ser criopreservados é imprescindível que sejam resistentes ao resfriamento (Herráez, 2009; Fornari et al., 2012). Portanto, o desenvolvimento de estudos relacionados à criopreservação de embriões passa necessariamente pela resposta com relação à toxidez dos agentes crioprotetores quando os embriões são submetidos a soluções crioprotetoras (Denniston et al., 2000). Com a tecnologia

disponível atualmente, sem a utilização de crioprotetores, este processo é impossível (Gwo et al., 1995; Zhang & Rewson, 1995; Hagedorn et al., 1997a; Hubálek, 2003; Streit Jr. et al., 2007; Fornari, 2009). Inúmeros fatores podem ser listados para explicar a toxidez dos crioprotetores, dentre eles: a velocidade (muito rápida ou muito lenta) de permeação do crioprotetor na estrutura ovo/embrião sendo; tipo e concentração de crioprotetor requerido para que este possa ser efetivo; tempo e a temperatura da solução crioprotetora durante a exposição dos embriões, dentre outros (Hagedorn et al., 1997b; Bart, 2000; Chao & Liao, 2001). Assim, as ações tóxicas do crioprotetor causam aos embriões, 1 - degeneração celular pela desidratação e as variações na osmolaridade dos tecidos embrionários; 2 - ou pela destruição física das células e desordem na divisão celular (Dinnyés et al., 1998; Kusuda et al., 2002).

Os principais problemas que envolvem o sucesso da congelação de embriões estão relacionados com a formação de cristais de gelo intracelulares (Denniston et al., 2000; Caetano et al., 2011). Para contornar este problema inúmeros métodos de criopreservação foram estudados (Herráez, 2009), sendo o resfriamento ultrarrápido ou vitrificação (Robles et al., 2005; Caetano et al., 2011). Em animais de produção e até mesmo em humanos as aplicações desta técnica são desenvolvidas com eficiência, segurança e menor custo (Caetano et al., 2011). A mesma consiste em submeter os embriões a soluções criopreservantes com altas concentrações de crioprotetor e após curto período de exposição imersão em nitrogênio líquido. Com isso o embrião entra rapidamente em um estágio de *glass-like* (ponto que a solução se torna vítrea), usando altas concentrações de crioprotetor, a desidratação é rápida e quase que total e, os líquidos que sobram se solidificam sem a formação de cristais de gelo, com uma redução substancial nos danos da congelação causados à célula (Isayeva & Zhang, 2004; Caetano et al., 2011).

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma espécie migradora, rústico ao manejo, apresenta crescimento precoce e possui hábito alimentar onívoro (Castagnolli & Zuim, 1985) sendo a espécie nativa com maior produção na piscicultura brasileira. Possui elevado potencial zootécnico e as qualidades de mercado a tornam alvo de pesquisas em diversas áreas, dentre elas a reprodução, como por exemplo, o desenvolvimento de biotecnologias como a criopreservação de embriões (Lopera-Barrero et al., 2011).

O objetivo do estudo foi avaliar a toxidez das soluções crioprotetoras dos embriões de *C. macropomum* a fim de desenvolver um protocolo para o processo de vitrificação.

### **Material e métodos**

#### *Coleta dos embriões*

Reprodutores de *C. macropomum* (machos e fêmeas) prontos para reprodução foram selecionados, avaliando as seguintes características: abdômen abaulado e macio, com orifício urogenital avermelhado e intumescido (fêmeas) e, liberação de sêmen com uma leve compressão no abdômen dos machos. Após a seleção, os reprodutores foram induzidos à reprodução com extrato de hipófise de carpa e após, 260 horas graus, procedeu-se a extrusão dos gametas e à fertilização artificial.

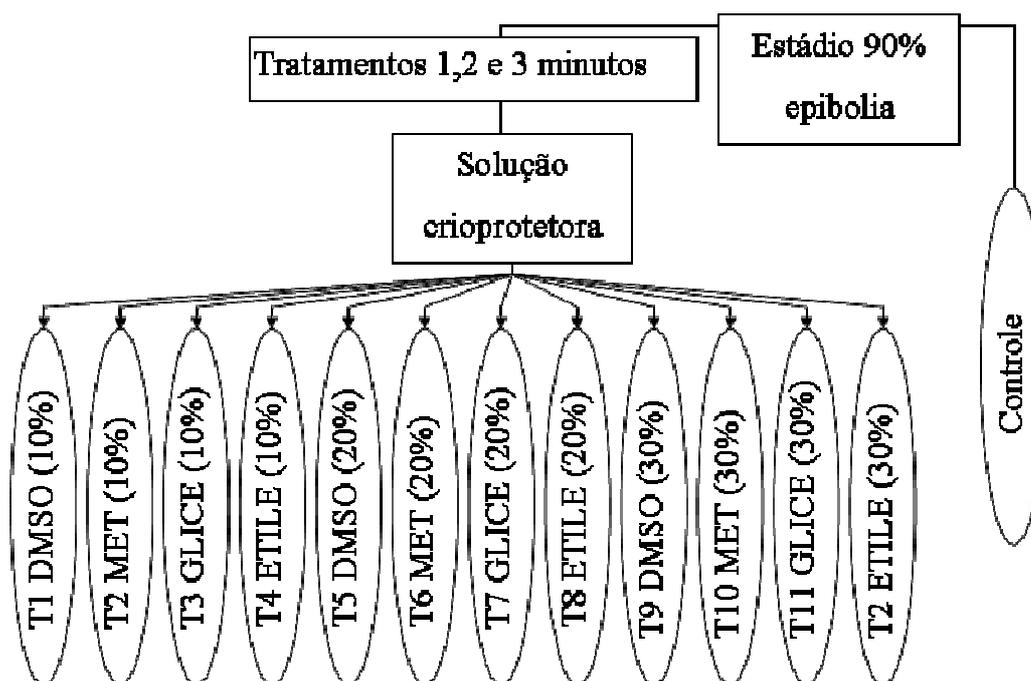
#### *Soluções crioprotetoras*

As soluções crioprotetoras foram preparadas no dia do experimento, arranjadas em beakers devidamente identificados, em que os crioprotetores: metanol, DMSO, glicerol e etilenoglicol foram diluídos em 100 ml de água destilada para alcançar concentrações de 10, 20 e 30%, para serem utilizados nos testes.

#### *Exposição dos embriões à solução crioprotetora*

Após a fertilização dos oócitos, aguardando o período de tempo necessário ( $6h \pm 30min$  em temperatura de  $28^{\circ}C$ ) para que o desenvolvimento do embrião atingisse 90% de gastrulação, quando se colheu uma alíquota de ovos da incubadora. Drenando o excesso de

água com uma peneira e, alocou-se 10 embriões viáveis em uma placa de *petri* que continha 5 mL das diferentes soluções crioprotetoras a serem testadas. Assim, repetindo três vezes para todos os tratamentos (12 soluções) com intervalo de 30 segundos para cada, além dos tratamentos, mais uma alíquota de 10 embriões foi mergulhada em 5 mL contendo apenas água da incubadora, considerada controle (Figura 1), totalizando 390 embriões.



**Figura 1.** Esquema dos tratamentos que os embriões de *C. macropomum* foram submetidos durante os testes de toxicidade com crioprotetores. DMSO (Dimetil-sulfóxido), MET (metanol), GLICE (glicerol) e ETILE (eilenoglicol), com diferentes tempos de exposição, mais o controle.

Ao fim dos diferentes tempos preestabelecidos; um, dois e três minutos drenou-se a solução com uma peneira retendo os ovos para, em seguida, serem submergidos na água do sistema de incubação, retirando o excesso de solução crioprotetora. Em seguida todos os ovos submetidos aos diferentes tratamentos foram transferidos para placas de acrílico (Figura 2) individualmente alocados em “covas” de 4 ml, para melhor avaliação dos embriões.

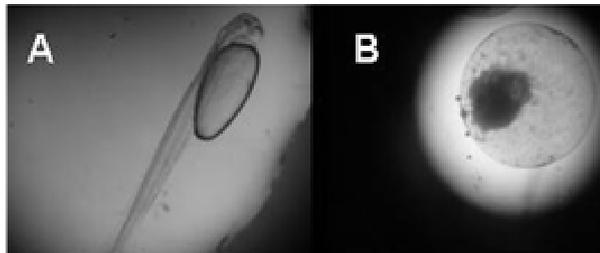


**Figura 2.** Placa de acrílico composta de covas com capacidade volumétrica de 4 ml, adaptada para estocar embriões de peixes durante a fase de desenvolvimento embrionário

*Avaliação da toxidez da solução crioprotetora*

A cada 30 minutos com auxílio de uma micropipeta foram realizadas trocas de água, ( $28\pm 1^\circ\text{C}$ ) dos embriões enquanto estavam mantidos nas respectivas das “covas” onde foram mantidos os embriões até a eclosão em larvas. Para avaliação dos tratamentos foi estabelecido um período de duas horas a partir da eclosão das larvas.

A avaliação consistiu em contabilizar o número larvas que eclodiram sadias e apresentavam movimentação regular (Figura 3A) e de ovos gorados, aqueles em que os embriões não evoluíram à larva (Figura 3B).



**Figura 3:** **A** – Larva de *C. macropomum*; **B** – Ovo gorado. Imagem obtida em estereomicroscópio por câmera digital (2,5X).

*Vitrificação*

Foram vitrificados 30 embriões de cada tratamento (crioprotetor versus concentração versus tempo) da seguinte forma: com cinco embriões foram submetidos aos tratamentos e alocados em palhete de 0,5 ml, imediatamente após, foram mergulhados diretamente no nitrogênio líquido, permanecendo até a descongelação. Depois de duas horas em nitrogênio líquido foram descongelados e mantidos em incubadoras para avaliar possíveis eclosões.

Para a descongelamento dos embriões vitrificados, utilizou-se o método de Streit Jr. et al. (2007) para resfriamento de embriões de pacu (*P. mesopotamicus*), porém com uma adaptação, preaquecendo os palhetes por entre as mãos por 30 segundos, antes de serem submergidos diretamente na água.

#### *Avaliação morfológica dos embriões*

##### *Microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

Para avaliar as ocorrências de injúrias no córion, blastoderme e vitelo foram eletromicrografados os embriões utilizando o MEV. As amostras foram colhidas de forma aleatória em todos os tratamentos, porém, em função do grande número de imagens foi estabelecida a avaliação dos embriões expostos por dois minutos na concentração de 20%, por ser o tempo e a concentração intermediária no teste de toxidez. Assim, após a descongelamento cinco embriões de cada tratamento foram fixadas em solução de Glutaraldeído 2,5% associado com tampão cacodilato 0,1M em pH 7,2. As amostras fixadas permaneceram na geladeira até a desidratação que ocorreu em série crescente utilizando álcool. Primeiro, a cada 30 minutos as amostras permaneceram na concentração de 30% de álcool, depois mais 30 minutos em 50% de álcool, novamente mais 30 minutos na concentração de 70% de álcool e, da mesma forma para 80, 90 e 95% de álcool. Por fim, dois banhos em álcool 100% por mais 30 minutos cada.

A secagem foi realizada em um aparelho de Ponto Crítico BAL-TEC CPD 030 (Critical Point Dryer), utilizando CO<sub>2</sub> líquido. Os fragmentos foram montados em bases metálicas de alumínio (stubs) e, em seguida, metalizados com íons ouro-paládio em Metalizador Desk II Denton Vacuum. O material foi examinado e eletromicrografado em microscópio eletrônico de varredura JEOL (JSM-5410).

#### *Análise estatística*

### *Toxidez dos crioprotetores*

Avaliou-se os efeitos dos crioprotetores, com diferentes concentrações em diferentes tempos de exposição sobre a probabilidade de sobrevivência dos embriões, utilizando modelos de regressão logística, em que se ajustou o comportamento das diferentes concentrações e tempos de exposição a cada crioprotetor. Nestas situações foram testados apenas os comportamentos lineares, em função do número de níveis. Para avaliar diferenças entre os crioprotetores utilizando teste de comparações múltiplas de médias, teste de t. Estas análises foram realizadas utilizando o PROC genmod do SAS versão 9.0 (2002), considerando a distribuição binomial com função logit.

### *Vitrificação*

A probabilidade de ocorrência de injúrias foi avaliada apenas nos tratamentos em que ocorreram embriões com córion e aparente preservação intacta, com a finalidade de ajustar o crioprotetor com potencial de preservar o embrião. Os tratamentos com glicerol e o etilenoglicol não foram avaliados, pois todos os embriões encontravam-se totalmente destruídos, portanto, foram apenas destacadas as principais injúrias de forma descritiva.

Para estimar as diferenças nas probabilidades de danificar o córion, blastoderme e extravasamento de vitelo, em função do crioprotetor interno DMSO e Metanol utilizando modelo logístico, implementado no Proc Genmod do sistema computacional SAS.

## **Resultados**

### *Toxidez dos crioprotetores*

Ao analisar os crioprotetores, o metanol foi o menos tóxico ( $p < 0,5$ ) em todas as concentrações e os tempos de exposição avaliados em comparação aos outros tratamentos (DMSO, glicerol e etilenoglicol). Independentemente da concentração e do tempo de exposição dos embriões na solução crioprotetora, 53% dos embriões de *C. macropomum*

expostos em metanol eclodiram em larvas. No tratamento com DMSO foi verificada em menor ( $p < 0,05$ ), proporção, 30% de larvas comparando com o metanol, porém superior ( $p < 0,05$ ) ao glicerol e etilenoglicol 12 e 0,7% de eclosão, respectivamente (Tabela 1).

**Tabela 1.** Eclosão média (%) de larvas de *C. macropomum*, quando expostos os embriões em diferentes crioprotetores.

<b>Tratamento</b>	<b>Eclosão (%)</b>
DMSO	30b
Metanol	53a
Glicerol	12c
Etilenoglicol	0,7c

Mesmas letras em cada coluna indicam igualdade pelo teste t. ( $p > 0,05$ ).

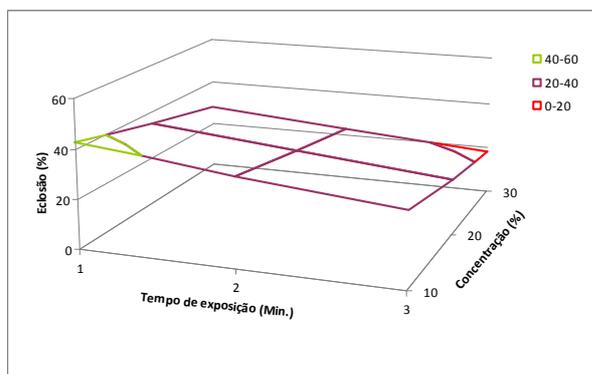
#### *Toxidez dos crioprotetores*

Quando o embrião foi exposto durante um minuto em 10% de DMSO, 40% dos embriões eclodiram, Aumentando o tempo para dois minutos o efeito da toxidez também aumentou, provocando redução pela metade da sobrevivência dos embriões, da mesma forma ocorreu para o tratamento com três minutos de exposição ao crioprotetor, diminuindo mais ainda a sobrevivência do embrião. O efeito da toxidez do DMSO em função do tempo foi mais severo quando se utilizou as concentrações de 20 e 30% (Figura 4).

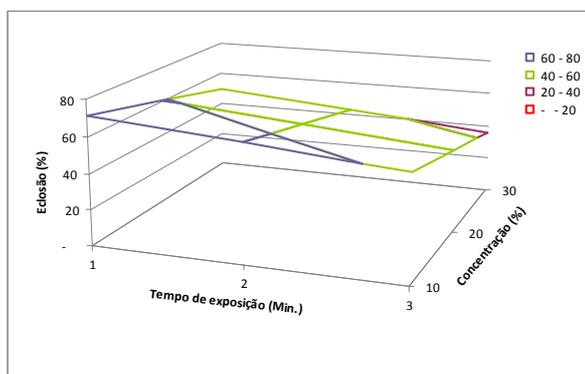
Muito embora, a interpretação dos resultados sugira o metanol como crioprotetor menos tóxico em comparação aos outros crioprotetores testados, o padrão de resposta que corresponde ao aumento do tempo de exposição e concentrações do crioprotetor se manteve com o mesmo comportamento dos demais tratamentos, ou seja, o aumento do tempo de exposição e concentrações maiores de metanol aumentou o efeito tóxico deste crioprotetor (Figura 5).

O glicerol na concentração de 10% com um minuto de exposição foi moderadamente tóxico (40% de eclosão das larvas), mesmo aumentando o tempo de exposição para dois ou três minutos a toxidez continuou moderada, no entanto, quando se aumentou a concentração para 20 ou 30%, o glicerol tornou mais tóxico e a taxa de eclosão foi praticamente nula na concentração de 30% (Figura 6).

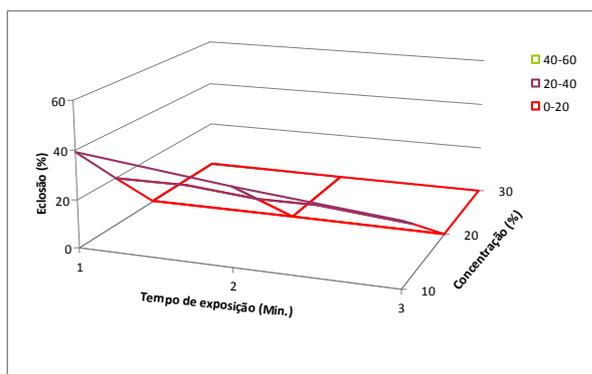
A reduzida taxa de eclosão das larvas de *C. macropomum* mesmo na menor concentração testada de etilenoglicol (10%), foi um indicativo da toxidez elevada deste crioprotetor. Os resultados negativos de toxidez aumentam à medida que aumentou tempo de exposição (dois a três minutos) e também nas concentrações de 20 e 30% (Figura 7).



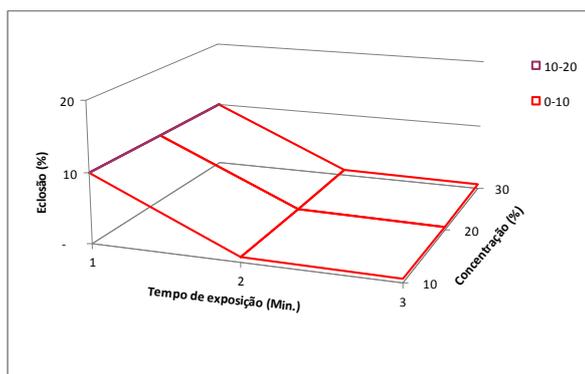
**Figura 4.** Toxidez de diferentes concentrações de DMSO combinado com diferentes tempos de exposição dos embriões de *Colossoma macropomum*, na taxa de eclosão das larvas.



**Figura 5.** Toxidez de diferentes concentrações de metanol combinado com diferentes tempos de exposição dos embriões de *Colossoma macropomum*, na taxa de eclosão das larvas.



**Figura 6.** Toxidez de diferentes concentrações de glicerol combinado com diferentes tempos de exposição dos embriões de *Colossoma macropomum*, na taxa de eclosão das larvas.



**Figura 7.** Toxidez de diferentes concentrações de etilenoglicol combinado com diferentes tempos de exposição dos embriões de *Colossoma macropomum*, na taxa de eclosão das larvas.

### *Vitrificação dos embriões*

Após a descongelação dos embriões não foi observado eclosão em nenhum dos tratamentos. Durante o período de incubadora, logo após a descongelação alguns embriões apresentaram coloração translúcida, no entanto, duas horas depois, observou-se a totalidade dos embriões esbranquiçados.

### *Probabilidade de ocorrência de injúrias aos embriões expostos ao DMSO e metanol*

A maior probabilidade de ocorrer destruição do córion no processo de vitrificação foi observado na utilização do DMSO em comparação ao metanol ( $p < 0,06$ ). Embriões com vitelo extravasado seguiram o mesmo perfil da destruição do córion, maior ocorrência de danos ( $p < 0,05$ ) utilizando DMSO em comparação ao metanol. Embora tenha ocorrido alto percentual nos dois crioprotetores testados, o metanol foi mais eficiente em preservar as células do blastoderme que o DMSO (Tabela 2).

**Tabela 2.** Ocorrência (%) de injúrias causada pelo processo de vitrificação de embriões de *C. macropomum*, durante dois minutos em 20% de crioprotetores DMSO e metanol.

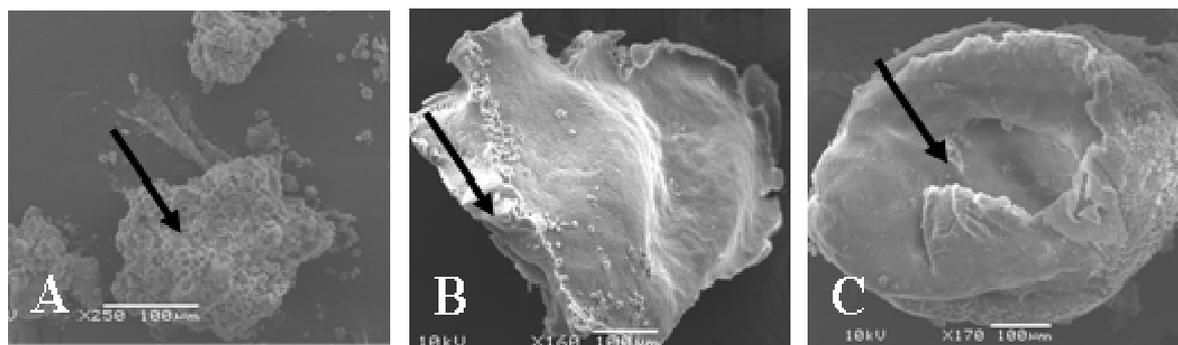
Compartimento do embrião	CRIOPROTETORES	
	DMSO	Metanol
Córion destruído	60a	35b*
Vitelo extravasado	40a	10b**
Blastoderme danificado	90a	81b*

Letras minúsculas diferentes em cada linha indicam existir diferença significativa entre os tratamentos \* $p < 0,06$  \*\* $p < 0,05$ .

#### *Avaliação descritiva das principais injúrias observadas após a vitrificação*

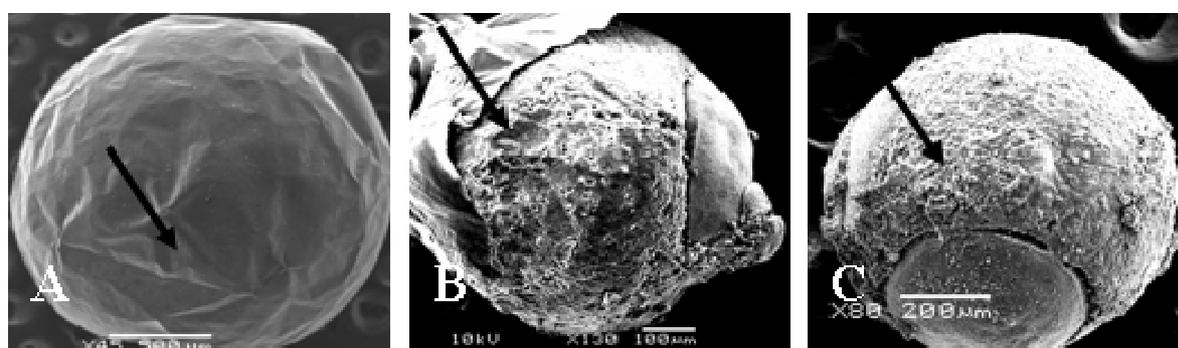
Para todos os tratamentos as principais injúrias foram apenas relatadas de forma descritiva, sem análise estatística, sendo que não houve ocorrência de córion intacto nos tratamentos com glicerol e etilenoglicol.

Na Figura 8 (A, B e C), está ilustrado o blastoderme danificado, vitelo desfigurado e extravasado de embriões de *C. macropomum*, obtidas por eletromicrografia de varredura após a vitrificação e descongelação sem crioprotetor, utilizando apenas água. Nesse tratamento, observaram células do blastoderme danificadas nas três imagens (Figura 8), vitelo totalmente desconfigurado e extravasado. Ainda, não foi encontrado córion em nenhum dos embriões.

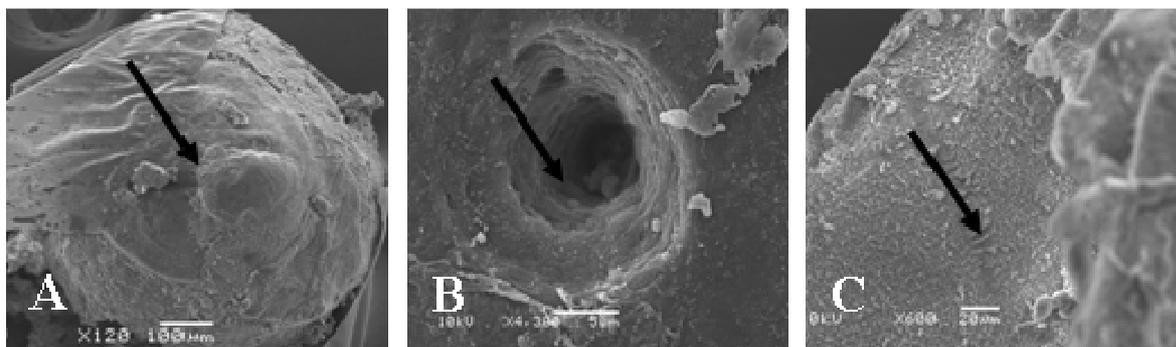


**Figura 8** – Eletromicrografia de varredura de embriões de *C. macropomum*, após congelação e descongelação sem crioprotetor; **A** – blastoderme com células destruídas; **B** – embrião com vitelo desconfigurado e blastoderme ausente; **C** – Vitelo extravasado e blastoderme danificado.

Muito embora, sendo observadas injúrias nos embriões de todos os tratamentos, as menores intensidades de injúrias foram verificadas nos tratamentos com crioprotetor em comparação aos embriões vitrificados sem crioprotetor. Na figura 9 (A, B e C), relaciona às imagens de embriões, após a vitrificação e descongelação, utilizando solução crioprotetora com 20% de metanol. Foram verificadas injúrias em todas as imagens registradas, porém em sua maioria a membrana vitelina não foi destruída. Além do metanol apenas no tratamento contendo DMSO foram encontrados embriões com córion, todavia, em menor quantidade. Com exceção dos embriões submetidos ao DMSO e metanol, nos demais, o córion estava com micrósporo totalmente danificado, principalmente os submetidos em glicerol e etilenoglicol além de inúmeras injúrias nas membranas do vitelo e blastoderme (Figura 10 A, B e C).



**Figura 9** – Eletromicrografia de varredura de embriões de *C. macropomum*, após congelação e descongelação utilizando solução crioprotetora contendo 20% de metanol; **A** – embrião com córion intacto; **B** – embrião com córion retirado manualmente, blastoderme danificada; **C** – Embrião na fase do fechamento do blastóporo apresentando injúrias celulares.



**Figura 10** – Eletromicrografia de varredura de embriões de *C. macropomum* após congelamento e descongelamento utilizando solução crioprotetora contendo 20% de DMSO na imagem **A**; 20% de etilenoglicol **B** e 20% de glicerol na imagem **C**.

**A** – embrião com blastoderme danificada e córion destruído; **B** – micrósporos com injúrias; **C** – vitelo aparentemente danificado.

### Discussão

#### *Toxidez dos crioprotetores*

Os tempos de exposição do embrião nas soluções crioprotetoras resultaram em respostas distintas com relação à toxidez, especialmente para os embriões que foram submetidos a três minutos nas diferentes soluções crioprotetoras em concentrações mais elevadas (30%). Mesmo sendo os crioprotetores essenciais para o processo de resfriamento e congelamento, Chao & Liao (2001) afirmaram que sempre causarão mortalidade de células.

No presente estudo, a toxidez dos crioprotetores foi perceptível, especialmente quando expostos por mais de dois minutos. Se observado pela ótica da combinação menos agressiva, 10% de metanol durante um minuto, o percentual de larvas sadias obtidas foi de 43,34%, ou seja, um pouco mais que a metade do percentual do controle, 92,96%. A toxidez extremamente agressiva dos crioprotetores para os embriões de *C. macropomum* pode estar relacionada com a explicação sugerida por Robertson et al. (1988), que afirmaram ocorrer uma modificação na permeabilidade das membranas para inúmeros íons, causando um choque osmótico, que resulta em um efeito tóxico indireto. Se, para o processo de vitrificação é importante a desidratação completa (Caetano et al., 2011) do mesmo modo que para qualquer técnica em que se utilize temperatura subzero, conhecer e saber o quanto são tóxicos os crioprotetores que realizam a desidratação completa é fundamental. Assim, para que ocorra tal

condição e daí a ação do crioprotetor seja eficiente é necessário um tempo de exposição ideal, que permita a desidratação completa sem que ocorra efeito tóxico e que de acordo com Streit Jr. (2005) há uma correlação ideal entre esses fatores.

A toxidez verificada na relação de tempo de exposição versus concentração versus crioprotetor foi evidente nos resultados encontrados nos embriões de *C. macropomum*. Se, por um lado, as combinações com metanol sempre foram menos tóxicas entre todas, já os resultados do glicerol foram pífios. Por outro lado, com 10% de glicerol não houve diferença entre os resultados com um, dois e três minutos. Este fato, seguramente está relacionado a propriedade positiva de entrada do glicerol na célula por um tempo curto de exposição. Muito embora a capacidade do glicerol em atravessar com facilidade a membrana celular, mantendo a osmolaridade interna e externa, seja uma propriedade positiva importante, também são conhecidas as propriedades negativas que o glicerol produz. De acordo com Fahy (1986) e posteriormente Woelders (1997) a concentração do glicerol usado como crioprotetor é limitada pela sua toxidez, ou seja, uma determinada concentração que para outro crioprotetor é considerada pouco tóxico, para o glicerol já é o suficiente para inviabilizar a sua utilização.

Muito embora o etilenoglicol tenha sido um crioprotetor tóxico para os embriões de *C. macropomum*, o fato a ser ressaltado é o desempenho menos tóxico na concentração de 20%, em todos os tempos de exposição testado, um, dois e três minutos, em relação aos outros crioprotetores. O etilenoglicol possui um baixo peso molecular e por isso tem uma rápida difusão através das células (Sommerfeld & Niemann, 1999; Kuleshova & Lopata, 2002) O tempo de estabilização osmótica do embrião quando submetido ao etilenoglicol poderia ser uma prerrogativa para explicar o fenômeno improvável que ocorreu na concentração de 10% os embriões de *C. macropomum*. Um resultado semelhante foi obtido por Streit Jr. (2005) com embriões de *P. mesopotamicus*, em que o autor relatou um aumento da taxa de eclosão

das larvas quando a concentração passou de cinco para 10% de etilenoglicol, porém com 10 minutos de exposição na solução crioprotetora.

O metanol no presente estudo foi o menos tóxico, permitindo uma boa eclosão das larvas (59,46%), em uma combinação própria para vitrificação, concentração de 20% durante dois min. de tempo de exposição. No atual estágio de desenvolvimento para a formulação de um protocolo para uma solução crioprotetora para embriões de espécies sul-americanas de peixes, o metanol seguidamente funciona de maneira eficiente. Nas espécies testadas até agora, *P. mesopotamicus* (Streit Jr. 2005; Streit Jr. et al., 2007; Fornari et al., 2010; Lopes et al., 2010; Fornari et al., 2012), *Rineleps áspera* (Fornari, et al., 2011) a eficiência do metanol tornou-se evidente. Desse modo a afirmação referente ao efeito tóxico do metanol (Ahammad, et al., 1998; Cabrita et al., 2003) para outras espécies estudadas (em sua maioria de clima temperado), aparentemente é inverso para espécies sul-americanas.

#### *Vitrificação*

Os embriões de *C. macropomum* descongelados após o processo de vitrificação não resistiram e foi verificado 100% dos ovos gorados. Todavia, observou-se hidratação e boa conformação em alguns embriões, sendo um indício positivo de que alguns embriões responderam positivamente ao processo de vitrificação, após o tratamento crioprotetor.

Durante a descongelação, alguns embriões apresentavam coloração esbranquiçada, que segundo Zhang & Rawson (1996) indica a formação de cristais de gelo, durante o processo de vitrificação do embrião. Por outro lado, em inúmeros embriões a coloração era translúcida durante a descongelação que ainda no palhete eram boas a conformação (córion não estava danificado), sem alterações estruturais (vitelo não estava extravasado) e com boa hidratação. Nesse caso, foi observado em todos os tratamentos embriões com morfologia aparentemente inalterada (não quantificado), em sua grande maioria quando se utilizou a soluções com concentração de 30% de metanol e DMSO com dois e três minutos de exposição à solução. A

formação de cristais de gelo antes mesmo da descongelação foi constatada por Fornari et al. (2010) e Neves et al. (prelo) em embriões de *P. mesopotamicus* e por Ninhaus-Silveira et al. (2007) para embriões de *Prochilodus lineatus*. Nestes estudos, os pesquisadores observaram coloração esbranquiçada dos embriões ainda no palhete.

A eficiência observada dos tratamentos DMSO ou metanol a 20% por dois minutos abre uma boa possibilidade para o desenvolvimento eficiente da biotécnica estudada. Em estudos combinando crioprotetor versus concentração na congelação de embriões de *P. mesopotamicus* Fornari et al. (2010) e Neves et al. (prelo) relataram alterações morfológicas em todos os tratamentos. Destacaram, no entanto, o potencial do metanol como crioprotetor intracelular que para Fornari et al. (2010) o efeito benéfico pode ser potencializado associando a sacarose (crioprotetor extracelular) na criopreservação de embriões de peixes.

Estudando crioprotetores na congelação de embriões de *P. mesopotamicus*, Fornari et al. (2010), Neves et al. (prelo) e Ninhaus-Silveira et al. (2007) na congelação de embriões de *P. lineatus*, destacaram as principais injúrias causadas pelo processo com auxílio da eletromicrografia de varredura. As injúrias provocadas na estrutura dos micrósporos, microestruturas responsáveis pela proteção e troca de fluidos entre o embrião e o meio externo (Rawson et al., 2000), ilustram seguramente a toxidez dos crioprotetores. Deste modo, pode-se evidenciar que as alterações no córion dos embriões de *C. macropomum* podem ter sido causadas pelo fluxo/influxo abrupto da água e do crioprotetor. Essa ação mecânica é prevenida utilizando crioprotetores extracelulares em especial a sacarose (Woeldrs, 1997). Esta pode ser uma boa explicação para a reduzida toxidez do metanol quando associado à sacarose destacado no estudo de Streit Jr. et al. (2007), resfriando embriões de *P. mesopotamicus*. Mesmo que a concentração do metanol neste referido estudo tenha sido de apenas 10%, os embriões ficaram em contato com a solução crioprotetora por longas seis horas resfriadas, não havendo diferença de taxa de eclosão para o controle. Seguramente

associar altas concentrações de metanol com sacarose, para um estudo de vitrificação seria uma boa opção a ser avaliada.

### Conclusão

O metanol é um potencial crioprotetor para os estudos de criopreservação de embriões de tambaqui (*C. macropomum*).

### Agradecimentos

Ao projeto Aquabrazil (Embrapa) aos grupos de pesquisa Peixegen-UEM e *Aquam-UFRGS* pelo fomento e apoio técnico a *Delicious Fish* pelos animais cedidos e estrutura física de laboratório e ao CNPq pela bolsa concedida.

### Referências

- BART, A. New approaches in cryopreservation of fish embryos. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. (Eds.). **Cryopreservation in aquatic species. World Aquaculture Society**. Baton Rouge, 2000 p.179-187.
- CAETANO, J.P.J.; COTA, A.M.M.; LAMAITAI, R.M. Criopreservação de Embriões e Banco de Embriões. In: ALMODIN, C.G. & COSTA, R.R. (Eds.). **Criopreservação de gametas, embriões e tecidos germinativo em laboratório de fertilização in vitro**. Rio de Janeiro: Cultura Médica. 2011, p.105-117.
- CASTANHOLLI, N.; ZUIM, S.M.F. Consolidação do conhecimento adquirido sobre o pacu, *Colossoma mitrei* – Berg, 1895. **Boletim Técnico do CEPTA**. São Paulo, v.5, n.1, p.1–2, 1985.
- CHAO, N.H.; LIAO, I.C. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. **Aquaculture**. London, v.197, n.1, p.161-189, 2001.
- DENNISTON, R.; MICHELET, S.; GODKE, R.A. Principles of cryopreservation. In: TIERSCH, T.R. e MAZIK, P.M. (Eds.). **World Aquaculture Society**: Baton Rouge. p.59-74, 2000.
- DINNYÉS, A.; URBÁNYI, B.; BARANYAI, B. MAGYARY, I. Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants: work in progress. **Theriogenology**. Amsterdam, v.50, n.1, p.1-13, 1998.
- FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. **Cryobiology**, San Diego, v.23, n.1, p.1-13, 1986.
- FORNARI, D.C. **Crioprotetores no resfriamento e congelamento de embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2009. 58f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

- FORNARI, D.C.; RIBEIRO, R.P.; STREIT JR., D.P.; VARGAS, L.; MORAES, G.V.; GODOY, L.; OLIVEIRA, D. Effect of cryoprotectants on the survival of cascudo preto (*Rhinelepis aspera*) embryos stored at -8°C. **Zygote**, Cambridge, v.18 n.1, p.1-6, 2011.
- FORNARI, D.C.; RIBEIRO, R.P.; STREIT JR., D.P., VARGAS, L., GODOY, L., OLIVEIRA, C.A.L., DIGMAYER, M., GALO, J.M., NEVES, P.R. Increasing storage capability of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos by chilling: development of a useful methodology for hatcheries management. **CryoLettrs**, Lewes, v. 33, n. 2, p. 125-133, 2012.
- FORNARI, D.C.; RIBEIRO, R.P.; STREIT JR., D.P.; VARGAS, L.; MORAES, V.G. Freezing injuries in the embryos of *Piaractus mesopotamicus*. **Zygote**, Cambridge, n.19, v.2, p. 345-350, 2010.
- GWO, J.C.; STRAWN, K.; ARNOLD, C.R. Change in mechanical tolerance and chilling sensitivity of red drum (*Sciaenopus ocellatus*) embryos during development. **Theriogenology**. Stoneham, n.43, n.7, p.1155-1161, 1995.
- HAGEDORN, M.; HSU, E.; KLEINHANS, F.W. et al. New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation. **Cryobiology**, San Diego, v.34, n.4, p.335-347, 1997a.
- HAGEDORN, M.; KLEINHANS, F.W. Problems and prospects in cryopreservation of fish embryos. In. TIERSCH, T.R. e MAZIK, P.M. (Eds.). **World Aquaculture Society: Baton Rouge**. p.179-187, 2000.
- HAGEDORN, M.; KLEINHANS, F.W.; WEIDT, D.E. et al. Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. **Cryobiology**, San Diego, v.34, n.3, p.251-263, 1997b.
- HERRÁEZ, M. P. Criopreservación de gametas y embriones. In: Carrillo-Estévez, M. A. (Eds.). **La reproducción de los peces: Aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura**. Madrid: Fundación Observatorio Español de Acuicultura. 2009, p.477-530.
- HUBALÉK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**. San Diego, v.46, n.1, p.205-229, 2003.
- ISAYEVA, A.; ZHANG, T.; RAWSON, D.M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. **Cryobiology**, San Diego, v.49, n.3, p.114-122. 2004.
- KULESHOVA, L.L.; LOPATA, A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. **Fertility and Sterility**, Bethesda, v.78, n.3, p.449-454, 2002.
- KUSUDA, S.; TERANISHI, T.; KOIDE, N. Cryopreservation of chum salmon blastomeres by the straw method. **Cryobiology**. San Diego, v.45, n.1, p.60-67, 2002.
- LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; VARGAS, L.; POVH, J.A. PAIRRA, A. As principais espécies produzidas no Brasil. In. LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; MENDEZ, L.D.V.; POVEDA-PRRA, A.R. (Eds.). **Produção de organismos aquáticos: uma visão geral no Brasil e no mundo**. Guaíba: Agrolivros. 2011, p.143-215.
- LOPES, T. S. **Resfriamento de embriões de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (HOMLBERG, 1887) em diferentes fases do desenvolvimento ontogenético**. 2010, 65p. Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

- NEVES, P.R.; RIBEIRO, R.P.; STREIT JR., D.P.; NATALI, M.R.M.; FORNARI, D.C.; SANTOS, I.; GODOY, L. Injuries in pacu embryos (*Piaractus mesopotamicus*) after freezing and thawing. **Zygote**, Cambridge (Prelo).
- NINHAUS-SILVEIRA, A. Cryogenic preservation of embryos of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae) **Zygote**. Cambridge, v.16, n.1, p.1-11. 2008.
- NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A.; AGOSTINHO, C.A. Structural and ultrastructural characteristics of the yolk syncytial layer in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Teleostei; Prochilodontidae). **Zygote**. Cambridge, v.15, n.2, p.267-271, 2007.
- RAWSON, D.M.; ZHANG, T.; KALICHARAN, D.; JONGEBLOED L. Field emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy studies of the chorion, plasma membrane and syncytial layers of the gastrula-stage embryo of the zebrafish *Brachydanio rerio*: a consideration of the structural and functional relationship with respect to cryoprotectant penetration. **Aquaculture Research**, San Francisco, v.31, n.3, p.325-336, 2000
- ROBERTSON, S.M.; LAWRENCE, A.L.; NEILL, W.H.; ARNOLD, C.R.; McCARTY, G. Toxicity of the cryoprotectants glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol, sucrose, and sea salt solutions to the embryos of red drum. **The Progressive Fish-Culturist**. Bethesda, v.50, n.3, p.148-154, 1988.
- ROBLES, V.; CABRITA, E.; FLETCHER Z.L.; SHAERS, M.A.; KING, M.M.; HARRÁEZ, M.P. Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species. **Theriogenology**. Stoneham, n.46, n.7, p. 1636-1646, 2005.
- SOMMERFELD, V., NIEMANN, H. Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. **Cryobiology**. San Diego, v.38, n.1, p.95-105, 1999.
- STREIT Jr., D.P. **Crioprotetores e resfriamento de embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2005. 73f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- STREIT Jr., D.P.; DIGMAYER, M.; RIBEIRO, R.P.; SIROL, R.N.; MORAES, G.V.; GALO, J.M. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p.1199-1202. 2007.
- WOELDERS, H.; MATTHIJS, A.; ENGEL, B. Effects of trehalose and sucrose, osmolarity of the freezing medium and cooling rate on viability and intractness of bull sperm after freezing and thawing. **Cryobiology**, v.35, n.1, p.93-105, 1997.
- ZHANG, T.; RAWSON, D.M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology**. San Diego, v.32, n.3, p.239-246, 1995.
- ZHANG, T.; RAWSON, D.M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryo. **Cryobiology**. San Diego, v.33, n.3, p.1-13, 1996.
- AHAMMAD, M.M. et al. 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**, San Diego, v.37, n.4, p.318-324, 1998.
- CABRITA, E. ROBLES, V.; CHEREGUINI, O; WALLACE, J. C.; HERRÁEZ, M.P. Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). **Cryobiology**, San Diego, v.47, n.3, p.204-213, 2003

### **Conclusões gerais**

O metanol é um potencial crioprotetor para os estudos de criopreservação de embriões de peixes.

A sacarose em associação ao metanol promove efeito positivo para o resfriamento do embrião de tambaqui e devem ser testados também os processos de congelação e vitrificação.

Para o processo de vitrificação deve se testar sacarose associada a metanol, e o tempo de exposição nessa solução.

Para o método de congelação sugere testar curvas de resfriamentos com quedas mais rápidas, acima de 1°C por minuto. Outro ponto importante é a indução a cristalização (seeding), o tempo e método devem ser bem ajustados.