

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

UTILIZAÇÃO DE CRIOPROTETORES INTRA E  
EXTRACELULARES EM EMBRIÕES DE PACU (*Piaractus  
mesopotamicus*)

Autor: Patrícia Ribeiro Neves  
Orientador: Ricardo Pereira Ribeiro

Tese apresentada, como parte das exigências para a 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 - 2008

“Hoje levantei pensando no que tenho a fazer antes que o relógio marque meia-noite. É minha função escolher que tipo de dia terei hoje. Posso reclamar que está chovendo ou agradecer as águas por levarem a poluição.

Posso ficar triste por não ter dinheiro ou me sentir encorajado para administrar minhas finanças, evitando o desperdício. Posso reclamar sobre minha saúde ou dar graças por estar vivo. Posso me queixar dos meus pais por não terem dado o que eu queria ou posso ser grato por ter nascido. Posso reclamar por ter que ir trabalhar ou agradecer por ter trabalho. Posso sentir tédio com o trabalho doméstico ou agradecer a Deus por ter um teto para morar. Posso lamentar decepções com os amigos ou me entusiasmar com a possibilidade de fazer novas amizades. Se as coisas não saírem como planejei, posso ficar feliz por ter hoje para recomeçar. O dia está na minha frente, esperando para ser o que quiser. E aqui estou eu, o escultor que pode dar a forma. Tudo depende de mim...”

Charles Chaplin (1889-1977)

**Aos meus pais, Lázaro e Léia pelo apoio incondicional, e  
por sempre acreditarem na minha vitória.**

**Ao meu marido Luís Alberto, companheiro e amado, que  
tanto me deu forças para que eu atingisse meu objetivo.**

***A eles***

**Dedico este trabalho**

***Ao Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro***

Agradeço pela confiança depositada e pela orientação. Aos momentos de força, palavras amigas e animadoras, incentivando-me para que eu conseguisse superar os obstáculos e possibilitando a realização deste trabalho.

***À Prof. Dr. Maria Raquel Marçal Natali***

Um agradecimento especial à Raquel, que de forma corajosa enfrentou o desafio da orientação deste trabalho. Com muita prestatividade e carinho, sempre me apoiou durante as dificuldades na redação científica, muitas vezes deixando suas férias e família para me atender. Uma pessoa maravilhosa, minha "Mãe Científica", meu eterno agradecimento.

"Mestre é aquele que caminha com o tempo, propondo a paz, fazendo comunhão, despertando sabedoria. Mestre é aquele que estende a mão, inicia o diálogo e encaminha para a aventura da vida. Não é só aquele que ensina fórmulas, regras, raciocínios, mas aquele que também questiona e desperta para a realidade. Não é aquele que dá de seu saber, mas aquele que faz germinar o saber do discípulo. Feliz é aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina!"

(Cora Coralina)

## AGRADECIMENTOS

Agradecer é um gesto de humildade e um ato que muitas vezes acaba sendo muito pequeno por tantas maravilhas que recebemos. Por isso agradeço infinitamente a Deus que me deu a vida e sabedoria para o discernimento.

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta e indireta de muitas pessoas. Manifesto minha gratidão a todas elas e de forma particular:

À Universidade Estadual de Maringá por ter me recebido tão bem e ter permitido todos esses anos de “moradia”.

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia que possibilitou a continuidade da minha capacitação.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (Cnpq), pela concessão da bolsa de estudos, necessária para a realização deste curso.

Aos funcionários do Departamento e Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela gentileza e colaboração.

Aos funcionários da Estação de Piscicultura da UEM- CODAPAR, Geraldo, Vítor e Cleber pela colaboração e amizade.

À Estação de Hidrologia e Aqüicultura da Duke Energy International- Geração Paranapanema, em Salto Grande (SP).

Às técnicas do Laboratório de Histotécnica Animal da UEM, Maria Eurides e Maria Dos Anjos pela saudável convivência, amizade e por todo ensinamento das técnicas de histologia.

Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura pela utilização do laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura no Complexo Central de Apoio à Pesquisa da UEM –CONCAP

Às Profs. Andréa Bonato e Cristina Giatti pela grande amizade que conquistamos ao longo dessa caminhada. Obrigada pela recepção e apoio!

À amiga Heloísa Bressan Gonçalves pela amizade, pelo carinho que me recebeu em sua casa e por ter compartilhado comigo momentos difíceis do curso.

Ao colega e incentivador Danilo Streit Junior pelo apoio nas informações e na realização do trabalho.

Ao amigo de Graduação e Pós-graduação Jayme Povh pelos constantes incentivos.

Aos amigos que ganhei no decorrer destes anos, pela convivência harmoniosa, por todos os momentos que estivemos juntos, e que às vezes com simples palavras, me deram força e ânimo para os momentos difíceis: Lílian, Alexandra, Nelson, Darci, Juliana, Melani, Patrícia, Graciela.

Aos meus bens mais preciosos, meus pais, minha irmã e amiga Graziela, Evandro e Vera, meus sobrinhos Elis e Eduardo, meu marido, que mesmo sofrendo pela minha ausência, sempre me incentivaram e foram maravilhosos desejando comigo o meu sucesso.

À todos, obrigada de coração!

## **BIOGRAFIA**

Patrícia Ribeiro Neves, filha de Lázaro Ribeiro Neves e Izaléia Ribeiro, nasceu em Araçatuba, Estado de São Paulo, no dia 22 de agosto de 1977.

Em julho de 2003, concluiu o Curso em Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá – UEM – em Maringá, Paraná.

Em maio de 2005, concluiu o Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível Mestrado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Reprodução de Peixes.

Em março de 2005, iniciou o curso de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível Doutorado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Reprodução de Peixes.

No dia 09 de maio de 2008, submeteu-se à banca para a defesa da tese.

## ÍNDICE

	Página
<b>RESUMO</b> .....	xiv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>CAPÍTULO I</b> .....	1
<b>1. Introdução Geral</b> .....	2
<b>2. Revisão de Literatura</b> .....	3
2.1) Espécie: pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) .....	3
2.2) Fases do desenvolvimento embrionário.....	4
2.3) Criopreservação de embriões .....	7
2.4) Crioprotetores.....	11
2.5) Descongelamento e Sensibilidade ao frio.....	15
<b>3. Literatura Citada</b> .....	17
<b>OBJETIVOS GERAIS</b> .....	24
<b>CAPÍTULO II -Utilização de crioprotetores intra e extracelulares na preservação morfológica de embriões de pacu (<i>P. mesopotamicus</i>)</b> .....	25
<b>RESUMO</b> .....	26
<b>ABSTRACT</b> .....	27
<b>Introdução</b> .....	28
<b>Material e Métodos</b> .....	29
<b>Resultados e Discussão</b> .....	34
<b>Conclusão</b> .....	48
<b>Literatura Citada</b> .....	48
<b>CAPÍTULO III -Injúrias causadas em embriões de pacu (<i>P. mesopotamicus</i>) submetidos as técnicas de congelamento e descongelamento após utilização de crioprotetores intra e extracelulares</b> .....	52
<b>RESUMO</b> .....	53
<b>ABSTRACT</b> .....	54
<b>Introdução</b> .....	55
<b>Material e Métodos</b> .....	56
<b>Resultados e Discussão</b> .....	60
<b>Conclusão</b> .....	68
<b>Literatura Citada</b> .....	68
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	71

## TABELAS DO APÊNDICE

	Página
CAPÍTULO II	25
Tabela 1- Médias e desvios padrões para as características de preservação embrionária: córion (CO), preservação do vitelo (VITP), acidofilia dos grânulos de vitelo (VITG), quantidade de núcleos da camada sincicial vitelina (CSVQ), formato dos núcleos da camada sincicial vitelina (CSVF), tamanho dos núcleos da camada sincicial vitelina (CSVT) e diferenciação celular da camada germinativa primária (CGP).....	35
Tabela 2- Análise de <i>deviance</i> para avaliar diferenças significativas entre os crioprotetores metanol e etilenoglicol, com ou sem a utilização de sacarose, para a característica córion.....	36
Tabela 3- Análise de <i>deviance</i> para avaliar diferenças significativas entre os crioprotetores metanol e etilenoglicol, com ou sem a utilização de sacarose, para a característica de preservação do vitelo.....	38
Tabela 4- Análise de <i>deviance</i> para avaliar diferenças significativas entre os crioprotetores metanol e etilenoglicol, com ou sem a utilização de sacarose, para a característica acidofilia dos grânulos de vitelo.....	40
Tabela 5- Análise de <i>deviance</i> para avaliar diferenças significativas entre os crioprotetores metanol e etilenoglicol, com ou sem a utilização de sacarose, para a característica de quantidade de núcleos da camada sincicial vitelina.....	41
Tabela 6- Análise de <i>deviance</i> para avaliar diferenças significativas entre os crioprotetores metanol e etilenoglicol, com ou sem a utilização de sacarose, para a característica de formato dos núcleos da camada sincicial vitelina.....	43
Tabela 7- Análise de <i>deviance</i> para avaliar diferenças significativas entre os crioprotetores metanol e etilenoglicol, com ou sem a utilização de sacarose, para a característica de tamanho dos núcleos da camada sincicial vitelina.....	44
Tabela 8- Análise de <i>deviance</i> para avaliar diferenças significativas entre os crioprotetores metanol e etilenoglicol, com ou sem a utilização de sacarose, para a característica de diferenciação celular das camadas germinativas.....	45

Tabela 9- Análise de estimação dos parâmetros da regressão multinomial logística para a característica de formato dos núcleos da camada sincicial vitelina (CSVF).....	46
Tabela 10- Análise de estimação dos parâmetros da regressão multinomial logística para a característica de tamanho dos núcleos da camada sincicial vitelina (CSVV).....	47
Tabela 11- Respostas médias das características de formato e tamanho dos núcleos da camada sincicial vitelina (CSVF e CSVV) submetidos a diferentes concentrações de crioprotetores metanol e etilenoglicol.....	47

## FIGURAS DO APÊNDICE

	Página
CAPÍTULO I	1
Figura 1 - Imagem de um embrião e estruturas extra-embriônicas de teleósteo evidenciando os principais compartimentos: córion, espaço perivitelino, blastoderme, camada sincicial vitelina e vitelo.....	6
CAPÍTULO II	25
Figuras 1 - Indicação dos componentes embrionários e extra-embriônicos de pacu ( <i>P. mesopotamicus</i> ). A- Imagem obtida a partir de estereomicroscópio. B- Fotomicrografia do embrião em estágio de fechamento do blastóporo H.E (10x).....	30
Figura 2- Esquema dos tratamentos que os embriões de pacu ( <i>P. mesopotamicus</i> ), em estágio de fechamento do blastóporo, foram submetidos, durante 10 minutos, com as soluções crioprotetoras intracelulares, metanol e etilenoglicol em diferentes concentrações, e o crioprotetor extracelular sacarose 0,1 M.....	31
CAPÍTULO III	52
Figuras 1 - Indicação dos componentes embrionários e extra-embriônicos de pacu ( <i>P. mesopotamicus</i> ). A- Imagem obtida a partir de estereomicroscópio. B- Fotomicrografia do embrião em estágio de fechamento do blastóporo H.E (10x).....	57
Figura 2 - Esquema dos tratamentos que os embriões de pacu ( <i>P. mesopotamicus</i> ), em estágio de fechamento do blastóporo, foram submetidos, durante 10 minutos, com as soluções crioprotetoras intracelulares, metanol e etilenoglicol em diferentes concentrações, e o crioprotetor extracelular sacarose 0,1M.....	58
Figura 3 - Esquema para a retirada dos crioprotetores e conseqüente hidratação dos embriões de pacu ( <i>P. mesopotamicus</i> ), em estágio de fechamento do blastóporo, submetidos a diferentes agentes crioprotetores, metanol e etilenoglicol, em três concentrações diferentes, durante 10 minutos.....	59
Figuras 4 - Embriões de pacu ( <i>P. mesopotamicus</i> ). A- Indicação dos embriões dentro do palhete com coloração esbranquiçada. B- Embrião gorado após descongelação e hidratação colocado em incubadora (estereomicroscópio).....	61
Figura 5 – Embriões de <i>Piaractus mesopotamicus</i> criopreservados. A- vitelo com aparência de massa celular (♣), córion rompido (*) (40x). B- CSV envolvendo pedaço de vitelo (♦), pequena porção de blastoderme (▶) (20x).	65

C- CSV com espessura variada (♦) (10x). D- blastoderme ausente, vitelo com aparência de massa celular (♣) (20x). H-E.....

Figura 6 - Eletromicrografia de varredura de embriões de *P. mesopotamicus*, não criopreservados. A- evidenciando vitelo sem rompimento, com pequena perfuração devido à manipulação (39x). B- vitelo rompido mecanicamente, evidenciando grânulos de vitelo (80x). C- (\*) evidenciando embrião envolvendo o vitelo (40x). D- embrião envolvido pelo córion (80x)..... 67

Figura 7 - Eletromicrografia de varredura de embriões de *P. mesopotamicus* criopreservados. A- vitelo envolvido pelo córion rompido, presença de grânulos de vitelo extravasado (40x). B- vitelo envolvido pelo córion, que está rompido (80x). C- evidenciando embrião destruído (40x). D- córion destruído (40x)..... 68

## RESUMO

O objetivo nesse trabalho foi desenvolver uma metodologia de criopreservação de embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e analisar as injúrias causadas nestes embriões após a aplicação de crioprotetores intracelulares, metanol e etilenoglicol nas concentrações de 7%, 10% e 13% e a adição de um crioprotetor extracelular, a sacarose 0,1 M, durante a exposição de 10 minutos, submetidos as técnicas de congelação e descongelação. Após a exposição aos crioprotetores foram processados 10 embriões em historesina e avaliou-se a preservação morfológica de acordo com três categorias para as estruturas embrionárias e extra-embrionárias. Os crioprotetores utilizados não alteraram a preservação do córion. A sacarose teve efeito positivo sobre a preservação do vitelo quando comparada aos crioprotetores intracelulares. Maior acidofilia dos grânulos de vitelo indica efeito positivo apenas com a utilização de sacarose e interação do crioprotetor intracelular e sacarose. Houve efeito positivo com a utilização da sacarose para as características de número e tamanho dos núcleos presentes na camada sincicial vitelina, com efeito significativo da interação crioprotetor intracelular e sacarose sobre o tamanho dos núcleos. O crioprotetor intracelular etilenoglicol permitiu maior diferenciação das camadas germinativas comparado ao metanol, mas não houve diferença significativa de utilização da sacarose. A associação do etilenoglicol na concentração de 7% com a sacarose mostrou ser a melhor combinação de crioprotetores para preservação do vitelo e camadas germinativas de *P. mesopotamicus*. Para a análise da morfologia embrionária foram envasados e congelados 20 embriões/tratamento e após a descongelação três embriões, em média, resultantes desse processo foram incluídos em historesina, corados com hematoxilina-eosina e analisados em microscópio óptico (MO). Um palhete/tratamento contendo embriões foi descongelado e mantidos em incubadora com o objetivo de acompanhar o desenvolvimento, não resultando em eclosão de embriões. Amostras de dois embriões submetidos aos tratamentos com metanol e etilenoglicol na concentração de 10% associado ou não a sacarose e os tratamentos água e água com sacarose foram processados e analisados em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Apesar dos embriões apresentarem as estruturas típicas da fase, como, córion, vitelo, camada sincicial vitelina e blastoderme, as mesmas encontravam-se alteradas em 100% dos embriões quando analisadas em MO e MEV. O córion apresentou-se irregular e rompido; ausência de individualização dos

grânulos de vitelo; a camada sincicial vitelina apresentou formato, espessura e tamanho irregulares e a blastoderme apresentou núcleos alterados no formato e às vezes ausentes, localizada em regiões atípicas ou ausentes em alguns embriões. Nenhum tratamento foi efetivo para preservação do embrião e conseqüente eclosão. Os protocolos utilizados não evitaram a formação de gelo intracelular resultando em alterações morfológicas graves durante os processos de congelação e descongelação, inviabilizando os embriões de *P. mesopotamicus*.

Palavras-chave: embriões de *Piaractus mesopotamicus*, criopreservação, crioprotetores, injúrias celulares, microscopia eletrônica de varredura, preservação morfológica.

## ABSTRACT

This study aimed to develop a methodology of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos cryopreservation and to analyze the injury cells caused in these embryos after the cryoprotectants intracellulares, methanol and ethylene glycol applications, in concentrations of 7%, 10% and 13% with the addition of an extracellular cryoprotector, the sucrose 0,1 M. After the exposure 10 embryos were processed in historesin and the morphologic preservation was evaluated in agreement with three categories considering the characteristics: chorion, yolk, yolk syncytial layer and germ layers. The used cryoprotectors did not alter the chorion preservation. The sucrose had significant effect on yolk preservation when compared to the intracellulares cryoprotectors. A higher acidophilia of the yolk granules indicated a positive effect only when the sucrose was used and with the interaction of cryoprotector intracellular and sucrose. There was positive effect with the use of the sucrose for the number and size characteristics of nuclei present in the yolk syncytial layer with significant effect of the interaction between intracellular cryoprotector and sucrose on the nuclei size. The intracellular cryoprotector ethylene glycol allowed a higher differentiation of the germ layers when compared to the methanol, but there was not any significant difference in using sucrose. The association of the ethylene glycol in the concentration of 7% with sucrose showed to be the best cryoprotectors combination to the preservation of the yolk and germ layers of *Piaractus mesopotamicus*. To analyzed embryonic morphology a total of 20 embryos/treatment were fill and frozen and after thawing three embryos, on average, resultants of that process were included in historesin, stained with hematoxilin-eosin and analyzed under optical microscope (OM). A straw/treatment containing embryos was thawed and maintained in incubator with the objective in order to accompany the development, not resulting in embryos outbreak. Samples of two embryos submitted to the treatments with methanol and ethylene glycol in the concentration of 10% associated or not with sucrose and the treatments water and water with sucrose frozen and not frozen were processed and analyzed through scanning electron microscopic (SEM). In spite of the embryos presenting the typical structures of the phase such as chorion, yolk, yolk syncytial layer and germ layers they were altered in 100% when the embryos were analyzed under OM and SEM. The chorion became irregular and broken; absence of

individualization of the yolk granules; yolk syncytial layer presented shape thickness and irregular size and the blastoderm presented altered nuclei in the shape and sometimes lacking, located in atypical areas or absent in some embryos. No treatment was effective for embryo preservation and consequent appearance. The used protocols did not avoid the intracellular ice formation resulting in serious morphologic alterations during the freezing and thawing processes, making unfeasible the embryos of *P. mesopotamicus*.

**Key words:** embryos of *Piaractus mesopotamicus*, cryopreservation, cryoprotectants, injury cells, scanning electron microscopic, morphology preservation.

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO**

## 1. Introdução geral

Em 2004, a produção mundial pesqueira junto com a aquicultura alcançaram 106 milhões de toneladas. A aquicultura é o setor de produção de alimentos de origem animal com crescimento mais elevado, especialmente nos países em desenvolvimento. Este setor contribui com cerca de 1/3 do abastecimento mundial de produtos pesqueiros. A produção em cativeiro de peixes, crustáceos e moluscos está expandindo, tendo alcançado 30% da produção global nas últimas décadas, principalmente nos países em desenvolvimento (FAO, 2007).

Estimativas preliminares para o ano de 2005, baseadas em informações fornecidas pelos principais países produtores de pescado, indicam que o total da produção mundial pesqueira alcançou quase 142 milhões de toneladas, representando um aumento de mais de 1 milhão de toneladas comparado a 2004 (FAO, 2007). No Brasil, a produção na década atual foi cerca de 150-250 ton/ano o que corresponde a 15-25% da produção total de pescado produzido mundialmente (Godinho, 2007). Neste contexto, os peixes constituem o principal grupo de organismos aquáticos cultivados, com 80-85% da produção, seguidos pelos camarões marinhos e moluscos, sendo que as espécies mais cultivadas são as tilápias, carpas e bagres (Camargo & Pouey, 2005) e ainda tambaquis e surubins (Queiroz et al., 2002).

De acordo com as estatísticas providas pelo IBAMA, em 2005 foram cultivadas 114 mil toneladas de peixes exóticos e 56 mil toneladas de peixes nativos, da produção da piscicultura no Brasil. Os peixes redondos (espécies e híbridos do gênero *Piaractus* e *Colossoma* responderam por 82% da quantidade de peixes nativos cultivados.

Os avanços tecnológicos que viabilizaram a produção de peixes nativos no Brasil, em particular de peixes redondos, tiveram início na década de 80, com a utilização da propagação artificial e no início da década de 90, esse avanço consolidou-se com a utilização da tecnologia de criopreservação de sêmen de pacu. Hoje as pesquisas estão voltadas para o aperfeiçoamento do manejo reprodutivo e aplicação de biotecnologias nos processos reprodutivos como a criopreservação e resfriamento de embriões dessa espécie, permitindo um grande sucesso para a produção na aquicultura (Castagnolli & Zuim, 1985).

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1) Espécie: pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Holmberg, 1887)

O pacu (*P. mesopotamicus*) é um peixe da ordem Characiformes, família Characidae e subfamília Myleinae (Nakatani et al., 2001) anteriormente denominado de *Colossoma mitrei* (Géry, 1986). É originário da Bacia do rio Prata, especificamente encontrado nos rios Paraná, Paraguai e Uruguai (Gonçalves & Urbinati, 2005).

Em ambientes naturais sua coloração é quase preta, passando a amarelo brilhante quando está na cabeceira dos rios para efetuar a desova (Britski, 1999). O período reprodutivo dessa espécie estende-se de novembro a janeiro, tendo desova total e fecundação externa. Essa espécie realiza migrações reprodutivas a fim de liberar seus gametas (Romagosa et al., 1988).

Além da facilidade na adaptação às condições de cultivo, o pacu é uma das espécies mais promissoras para a piscicultura brasileira, pelo seu hábito alimentar onívoro, crescimento rápido, rusticidade, fecundidade elevada, fácil adaptação à alimentação artificial e grande aceitação no mercado consumidor (Castagnolli & Zuim, 1985).

Entretanto, esta espécie não se reproduz naturalmente em ambientes confinados, necessitando ser induzida a reprodução através de agentes hormonais, a fim de obter sucesso na reprodução (Castagnolli & Donaldson, 1981; Romagosa et al., 1988; Lima et al., 1991).

Observando as qualidades do *P. mesopotamicus*, em meados dos anos setenta, pesquisadores começaram a trabalhar com esta espécie a fim de desenvolver um pacote tecnológico para o cultivo deste peixe. Desde então, diversos trabalhos foram e vêm sendo desenvolvidos a fim de viabilizar a sua produção em larga escala (Castagnolli & Zuim, 1985; Lima et al., 1991; Pezzato et al., 1995; Silva et al., 1997).

O interesse por esta espécie passa por diversas áreas como a reprodução, economia, fisiologia geral, patologia e sanidade, manejo geral, todas visando a produção em larga escala (Castagnolli & Donaldson, 1981; Romagosa et al., 1985; Ceccarelli et al., 1988; Senhorini et al., 1988; Bernardinho & Melo, 1989; Bernardinho & Ferrari, 1989; Lima et al., 1989; Ceccarelli et al., 1990; Chabalin & Neves, 1996).

No início da década de noventa, trabalhos com congelação de sêmen de *P. mesopotamicus* despertaram grande interesse no aprofundamento do conhecimento nas diversas áreas pesquisadas, como: aplicação de novas tecnologias para a conservação de sêmen (Miliorini et al., 2002; Carolsfeld et al., 2003), utilização de diferentes tipos de indutores hormonais reprodutivos (Zaniboni Filho, 1995; Silva et al., 1997; Streit Jr. et al., 2002); estudo da embriogênese (Ribeiro et al., 1995), conhecimento da biologia reprodutiva (Romagosa & Narahara, 2002; Streit Jr. et al., 2005); permeabilidade de membranas e propriedades osmóticas das células (Ninhaus-Silveira et al, 2006).

Hagedorn et al. (1997b; 1998; 2004) utilizam “zebrafish” (*Brachydanio rerio*) como modelo de estudo para o desenvolvimento de uma biotecnologia de criopreservação de embriões de peixe. Esses autores relacionam algumas vantagens de se usar esta espécie, como: conhecimento da biologia reprodutiva desta espécie, resistência aos crioprotetores utilizados na congelação de embriões de mamíferos, facilmente adaptáveis aos ambientes. O “zebrafish” é um peixe pequeno e fácil de ser manipulado em laboratório, são altamente prolíficos, caracterizam-se por um rápido desenvolvimento, sendo que seus embriões são transparentes e facilmente observados em microscópico durante o desenvolvimento.

O *Piaractus mesopotamicus* tem sido adotado como espécie nativa modelo para estudos com criopreservação de embriões. Recentemente, importantes trabalhos têm sido realizados com a utilização dessa espécie para o desenvolvimento de uma tecnologia de resfriamento de embriões com diferentes soluções crioprotetores (Streit Jr. et al., 2007) assim como a criopreservação destes embriões (Streit Jr., 2005).

## **2.2) Fases do desenvolvimento embrionário**

O desenvolvimento embrionário de peixes tem sido estudado em diversas espécies brasileiras, dentre elas destacam-se as pesquisas realizadas com os teleósteos: *Prochilodus lineatus* (Castellani et al., 1994), *Colossoma macropomum* (Albuquerque et al., 1994), *Piaractus mesopotamicus* e o híbrido Tambacu (Ribeiro et al., 1995), *Pimelodus maculatus* (Luz et al., 2001), e a família dos Bryconinae, *Brycon cephalus* (Lopes et al., 1995; Romagosa et al., 2001), *Brycon insignis* (Andrade- Talmelli et al., 2001) e *Brycon orbignyianus* (Ganeco, 2003; Landinez et al., 2004).

No estudo do desenvolvimento embrionário, diferentes critérios são utilizados para estabelecer estágios ou fases (Matkovic et al., 1985; Carter & Wourms, 1991; Castellani

et al., 1994; Ribeiro et al., 1995; Kimmel, 1995; Nakatani et al., 2001). Para o pacu (*P. mesopotamicus*) Ribeiro et al. (1995) consideraram a morfologia externa do ovo e suas características microscópicas dividindo a embriogênese desta espécie em quatro fases: pós-fecundação: uma única célula; segmentação: incluindo as fases de mórula e blástula; morfogênese e organogênese inicial: incluindo as fases de gástrula inicial, intermediária e avançada; organogênese média, tardia e eclosão: desde o aparecimento dos primeiros pares de somitos até a eclosão das larvas.

O processo de estagiamento é uma ferramenta fundamental nos estudos de desenvolvimento, isto porque diferentes embriões, mesmo sendo de uma mesma prole, podem apresentar taxas e tempos de desenvolvimento ligeiramente diferentes. Esta diferença de tempo no desenvolvimento pode estar relacionada diretamente com a temperatura de incubação (Landinez et al., 2004).

Esta assincronia foi observada para embriões de “zebrafish” fertilizados simultaneamente com a mesma temperatura de incubação de 28°C (5-10 embriões/ml) (Walker & Streisinger, in Westerfield, 1983) e também concorda com as observações feitas por Kimmel et al. (1995) para outros teleósteos.

Além da temperatura, a quantidade de vitelo presente no ovo também influencia no tempo de desenvolvimento. Nos peixes, considera-se que quanto maior a quantidade de vitelo, mais lenta a velocidade de desenvolvimento embrionário (Ganeco, 2003).

O *Piaractus mesopotamicus*, conhecido como pacu, realiza migrações e se reproduz no leito dos rios na estação das chuvas. O período reprodutivo estende-se de novembro a janeiro, apresentando desova total ou única e não proteção à prole. Os ovócitos liberados são livres, de coloração amarelada e a fecundação é externa (Romagosa, 1988).

Os ovos de teleósteos, inclusive da espécie estudada, são telolécitos, pelo fato do vitelo estar concentrado no pólo vegetativo, com citoplasma e suas organelas localizadas no pólo animal, além disso, é visível a diferença entre os dois pólos animal e vegetal, após o processo de hidratação dos mesmos (Kimmel et al., 1995; Ribeiro et al., 1995).

Os ovos de pacu recém fecundados apresentam diâmetro de 2,69mm, o espaço perivitelino é amplo (25,41%) com tamanho médio de 1,41mm. A embriogênese dessa espécie ocorre rapidamente, podendo variar de acordo com a temperatura da água, permanecendo ao redor de 16 horas a 26,8°C (Nakatani et al., 2001).

A diferenciação inicia-se cerca de seis horas após a fecundação e a extremidade caudal solta-se depois de aproximadamente 12 horas, ocorrendo eclosão das larvas após 16 horas, medindo acerca de 3,05mm de comprimento total (Nakatani et al., 2001)

O período de hidratação pode variar entre as espécies devido ao tamanho do ovo, sendo de 30 minutos após fertilização para piracanjuba (Landinez et al., 2004), 20 minutos para o tambaqui (Albuquerque et al., 1994) e menos de um minuto para o pacu (Ribeiro et al., 1995).

A clivagem dos ovos de *P. mesopotamicus* é do tipo meroblástica ou parcial, por ocorrer apenas no pólo animal. Tal clivagem é típica dos ovos de peixes descrita por outros autores (Ribeiro et al., 1995; Ganeco, 2003; Landinez et al., 2004).

A Figura 1 representa a imagem de um embrião e estruturas extra-embriônicas de teleósteo evidenciando os principais compartimentos: córion, espaço perivitelino, blastoderme, camada sincicial vitelina e vitelo.

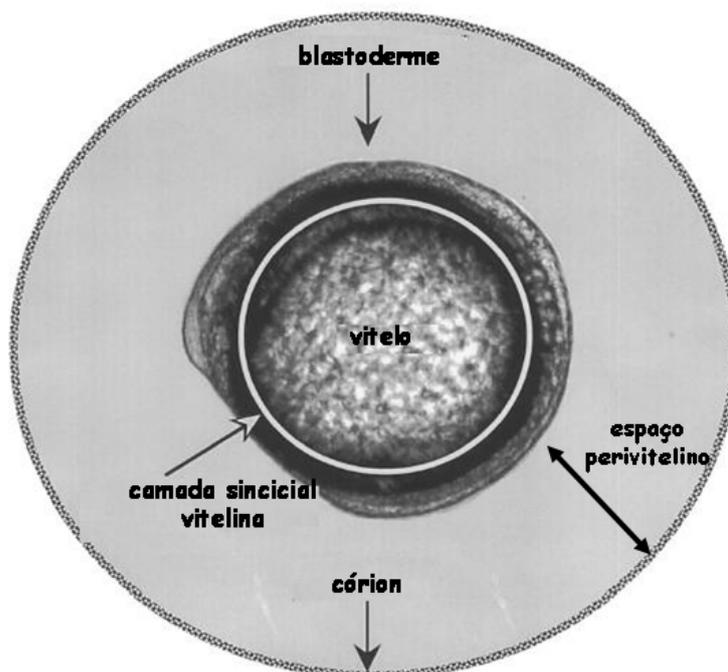


Figura 1 - Imagem de um embrião e estruturas extra-embriônicas de teleósteo evidenciando os principais compartimentos: córion, espaço perivitelino, blastoderme, camada sincicial vitelina e vitelo.

Fonte: Adaptado de Hagedorn et al., 1997a.

### 2.3) Criopreservação de embriões de peixes

Desde Blaxter (1953) quando em seus estudos aplicou a tecnologia da criopreservação de espermatozóide para “Atlantic herring” com aproximadamente 80% de motilidade celular, os estudos nessa área têm tido muito sucesso para teleósteos marinhos e de água doce, incluindo ciprinídeos, salmonídeos, siluriformes e characiformes (Harvey & Ashwood-Smith, 1982; Stoss & Donaldson, 1983; Leung & Jamison, 1991; Rana, 1995).

A criopreservação visa manter o metabolismo celular em estado quiescente, tornando possível a conservação de células e tecidos por tempo indeterminado. As técnicas atuais utilizadas para o armazenamento dos embriões são a congelação tradicional e a vitrificação.

O sucesso na criopreservação de embriões de peixe poderia abrir novas perspectivas no cultivo de peixes e no manejo de espécies ameaçadas de extinção e, além disso, ajudar na preservação de espécies raras (Wildt et al., 1993). Adicionalmente, esta tecnologia poderia fornecer embriões de algumas espécies em determinadas estações do ano quando não poderiam desovar naturalmente (Janik et al., 2000) permitindo um aumento na produção comercial (Wildt, 1989; 1993; Ballou, 1992). A habilidade de criopreservar embriões de teleósteos poderia permitir o estoque de uma grande diversidade de genes em um espaço mínimo.

Muitos problemas relacionados às características morfofisiológicas dos embriões impedem que a criopreservação de embriões de peixe tenha sucesso: (i) ovos da maioria das espécies são grandes (usualmente 1-7mm), resultando em uma baixa razão entre a superfície e o volume, o que pode retardar o fluxo/influxo da água e dos crioprotetores; (ii) grande tamanho dos grânulos de vitelo, o que pode aumentar a probabilidade da ruptura da membrana pela formação intracelular de gelo; (iii) ovos com presença de duas membranas (sistema compartimental, vitelo e blastoderme), possibilitando diferentes propriedades de permeabilidade; (iv) semipermeabilidade das membranas ao redor do embrião, como o córion, o que inibindo o fluxo/influxo da água e dos crioprotetores; (v) embriões com alta sensibilidade ao frio (Stoss, 1983; Harvey, 1983; Zhang & Rawson, 1995; Hagedorn et al., 1996; 1997a).

Processo de criopreservação de embriões pode ser extremamente prejudicial a organização celular do embrião. Dobrinsky (1996) citou em seus trabalhos que a

formação de cristais de gelo intracelular pode lesar a membrana plasmática da célula e que o armazenamento em nitrogênio ( $N_2$ ) pode desnaturar as funções intracelulares e as organelas. Em relação a citoarquitetura dos embriões, este autor verificou que pode ocorrer destruição das estruturas que participam do citoesqueleto, o que leva a perda da sua forma intracelular causando destruição irreparável a célula.

A prevenção da formação de cristais de gelo nas células ou tecidos é necessária para o sucesso na criopreservação e sobrevivência dos embriões. A comparação da sobrevivência dos embriões após resfriamento e porcentagem de embriões na qual houve a formação de gelo intracelular durante o resfriamento, mostrou que os padrões destas curvas são similares, indicando que a formação de gelo foi, provavelmente, o principal fator de limitação da sobrevivência dos embriões (Harvey, 1983).

Os procedimentos da criopreservação para cada tipo de embrião e célula deveriam ser feitos individualmente, baseados em um completo entendimento da permeabilidade celular (Hagedorn et al., 1997). Quando as membranas celulares são expostas aos gradientes da água e dos crioprotetores, o fluxo desses constituintes ocorre através das membranas, se esta for permeável à água e aos crioprotetores (Hagedorn et al., 1997). A taxa de congelamento ótima depende da permeabilidade da membrana e dos solutos, de uma maneira complexa. Por exemplo, se a taxa de congelamento é muito rápida, pode haver um tempo insuficiente para a desidratação celular, ocasionando um congelamento intracelular, causando a lise da célula pela formação (cristalização) de gelo intracelular. Em contraste, se a taxa de congelamento é muito lenta, os embriões podem ser danificados irreparavelmente devido a excessiva desidratação citoplasmática (Mazur, 1963; 1984; Rall, 1992).

Hagedorn et al. (1997) identificaram dois fatores para o insucesso nos protocolos de criopreservação de embriões de peixes, ambos relacionados à permeabilidade da água e do crioprotetor. O primeiro está relacionado a membrana protetora externa, córion. Esta camada não celular composta, principalmente, por glicoproteínas (Begovac & Wallace, 1986; Hamazaki et al., 1985) poderia dificultar a entrada e saída da água e dos crioprotetores no embrião (Harvey, 1982). Esta estrutura de proteção pode ser removida por microcirurgia que em grande escala ou em rotinas de criopreservação poderiam ser inviáveis.

No entanto, recentemente, os trabalhos realizados nesta área têm utilizado um método seguro e fácil que foi desenvolvido por Westerfield (1983) para embriões de “zebrafish”, para a remoção dessa estrutura. Utiliza-se uma enzima denominada pronase

que além de ser prática é de grande utilidade para uma variedade de espécies. Ninhaus-Silveira et al. (2006) utilizaram 0,25 mg/mL de pronase a 28° C por 30 segundos para embriões de curimatá (*Prochilodus lineatus*) conseguiram a retirada completa do córion, observando que a enzima não foi tóxica aos embriões.

O segundo fator para o insucesso nos protocolos de criopreservação está relacionado as informações insuficientes na cinética da permeação dos crioprotetores para dentro dos compartimentos, envolvendo a distribuição e comportamento osmótico da água no interior da blastoderme e do vitelo, necessitando de uma melhor compreensão da taxa de passagem da água através da membrana e do citoplasma do embrião.

Nos embriões de peixes a camada sincicial vitelina (CSV) também tem sido identificada como um dos principais obstáculos para o sucesso das técnicas de criopreservação, por impedir a penetração do crioprotetor na região do vitelo (Zhang & Rawson, 1996; Janik et al., 2000). Essa camada é um sincício citoplasmático e também pode ser denominada periblasto, está subjacente a blastoderme, recobrando o vitelo, posicionando-se de forma extra-embriônica, não contribuindo, portanto, para a formação do corpo do embrião, sendo uma característica comum a todos os teleosteos (Balinsky, 1970).

Ela diferencia-se das demais células da blastoderme por apresentar maior basofilia, com aproximadamente 10 µm de espessura tornando-se mais delgada, 2 µm em “zebrafish” (Hisaoaka & Firlit, 1960; Kimmel et al., 1995) além de ser uma estrutura de sustentação e separação do vitelo (Ninhaus-Silveira et al., 2006) sendo significativa na disponibilidade do vitelo para o embrião, tornando-o viável para o desenvolvimento embrionário (Balinsky, 1970; Trinkaus, 1984). Trinkaus (1984) e Kimmel et al. (1995) ressaltam que essa camada parece ser o motor para o movimento de epibolia.

Com relação a importância da CSV na incorporação do vitelo pelo embrião, parece que as microvilosidades encontradas na parte superior desta camada as quais são projeções de membranas que se estendem por entre os glóbulos de vitelo, em *Prochilodus lineatus*, indicam que o material vitelínico é quebrado através de enzimas hidrolíticas como sugerido por Ninhaus-Silveira (2007) e, então, transferido para a blastoderme.

Em trabalho realizado por Hagedorn et al. (1996) estes autores descreveram que a CSV é a principal barreira para o influxo dos crioprotetores dentro do vitelo, criando uma barreira de permeabilidade entre o vitelo e a blastoderme, na qual minimiza a

entrada e saída da maioria dos crioprotetores. Em 1998, estes mesmos autores em estudos de permeabilidade em embriões de “zebrafish”, observaram que o dano do crioprotetor ao embrião é em grande parte devido a crioproteção insuficiente na região de conexão do vitelo com a CSV.

No entanto, Ninhaus-Silveira (2007) em trabalho para caracterizar a CSV demonstrou que não há características ultraestruturais indicadoras de que esta membrana se constitua como uma barreira à entrada de crioprotetores, como destacado por Hagedorn et al. (1996; 1998).

Outro método de congelamento muito utilizado para embriões de mamíferos tem sido recomendado para embriões de peixes, a vitrificação, a qual evita a formação de cristais de gelo intracelulares e extracelulares que são os responsáveis pela danificação das membranas e organelas celulares. Esse processo é determinado pelo uso de crioprotetores em altas concentrações e rápidas taxas de resfriamento (Papadopoulos et al., 2002). Para criopreservação de embriões de zebrafish a vitrificação parece ser um método atrativo porque reduz os danos ultra-estruturais a várias células, causados pela formação intra e extracelular de cristais de gelo (Rall, 1987; Kasai, 1996) e remove os efeitos deletérios da sensibilidade ao frio dos embriões (Zhang & Rawson, 1995; Hagedorn et al., 1997).

A toxidez do agente crioprotetor é um dos fatores mais críticos no sucesso da vitrificação de embriões, variando conforme a concentração, o tempo e a temperatura de exposição. Além disto, embriões de diferentes espécies ou estádios de desenvolvimento podem tolerar diferentes níveis de exposição a agentes crioprotetores (Dinnyés et al., 1998; Ahammad et al., 1998; Zhang & Rawson, 1995).

Em experimentos com protocolos de vitrificação onde houve total destruição da camada sincicial vitelina, Hagedorn et al. (1998) sugeriram que mudanças sutis também podem ter ocorrido na blastoderme e no vitelo após os tecidos terem sido congelados e descongelados, citando que a mera presença de elementos estruturais dentro dos tecidos não significa que eles estão presentes em quantidades suficientes para uma função celular normal.

Em trabalho recente, Hagedorn et al. (2004) estudando a temperatura de formação do gelo dentro e fora dos embriões de “zebrafish”, demonstraram que o congelamento lento não é uma opção satisfatória para a preservação de embriões de peixes, indicando que é necessário aumentar as pesquisas com vitrificação. Estes autores sugerem que as pesquisas na área de biologia molecular podem contribuir para a descoberta de uma

metodologia de criopreservação, tal como a introdução de poros na CSV, através de procedimentos químicos (anticorpos) ou físicos (eletroporação).

Apesar das tentativas de criopreservação com várias espécies, “herring” (*Clupea harengus*), “rainbow trout” (*Oncorhynchus mykiss*), “coho salmon” (*Oncorhynchus kisutch*), “brook trout” (*Salvelinus sp.*), “zebrafish” (*Brachydanio rerio*), “common carp” (*Cyprinus carpio*), “red drum” (*Sciaenops ocellatus*) e “flounder” (*Paralichthys olivaceus*) ter tido sucesso limitado (Zell, 1978; Whittingham, 1980; Stoss & Donaldson, 1983; Zhang et al., 1993; Janik et al., 2000; Chen, 2004), recentemente muitos trabalhos têm sido desenvolvidos na tentativa de solucionar os problemas relacionados as dificuldades de criopreservação de embriões (Cloud, 2000; Streit Jr. et al., 2000; Ahammad et al., 2002; Dobrinsky, 2002; Ahammad et al., 2003; Beirão, 2006; Ninhaus-Silveira et al., 2006; Streit Jr. et al., 2007).

#### **2.4) Crioprotetores**

Os crioprotetores têm como função proteger as células e tecidos durante a criopreservação e descongelação (Beirão, 2006). Podem ser divididos em duas categorias: intracelulares e extracelulares.

Os crioprotetores intracelulares são solutos orgânicos responsáveis por proteger as organelas das células durante o resfriamento. São moléculas com baixo peso molecular e desta maneira podem atravessar as membranas celulares com relativa facilidade. Os mais comumente utilizados são o etilenoglicol, propilenoglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, metanol e etanol. Os crioprotetores extracelulares são as macromoléculas e açúcares cujas funções são reduzir a formação de gelo, facilitar a desidratação das células e proteger a membrana celular, possuem alto peso molecular não podendo permear as células. Os mais utilizados são a sacarose, glicose, lactose, trehalose, polivinilpirrolidona (PVP) e manitol (Niemann, 1991; Denniston et al., 2000).

O funcionamento do crioprotetor está relacionado aos processos de entrada de crioprotetor e saída da água na pré-congelação; entretanto, na descongelação dos embriões este processo é inverso. Segundo Schneider & Mazur (1984) o embrião quando exposto a um crioprotetor intracelular, retrai devido a perda de água causada pela hiperosmolaridade inicial do meio extracelular, e também porque o embrião é mais permeável a saída de água do que a entrada do crioprotetor. O índice de entrada do

crioprotetor depende do coeficiente de permeabilidade deste e da temperatura da solução. O equilíbrio é atingido quando o embrião retorna ao seu volume anterior em meio isotônico.

As características fundamentais para um eficiente agente crioprotetor é o baixo peso molecular, como é o caso dos crioprotetores intracelulares, sua alta capacidade de atravessar a membrana celular e uma baixa toxicidade (Kasai et al., 1996). Em geral, agentes com rápida capacidade de penetração são mais favoráveis, porque o tempo de exposição ao crioprotetor antes do rápido resfriamento é curto, prevenindo assim, as injúrias osmóticas (Kasai et al., 1996).

Os crioprotetores extracelulares permitem a redução da concentração dos crioprotetores intracelulares, diminuindo a toxicidade celular. Segundo Rall (1987) a sacarose tem o efeito adicional de proteção celular, pois este crioprotetor causa desidratação em embriões de camundongo, reduzindo a quantidade de água no citoplasma da célula e desta forma, evitando a formação de gelo intracelular. Entretanto, Martinez et al. (2002) demonstraram que altas concentrações de sacarose (0,5M) resultaram em baixas taxas de nascimento para embriões de bovinos.

As altas concentrações de crioprotetores podem causar danos as células devido a sua toxicidade química. Porém, os efeitos da toxicidade podem ser minimizados através da exposição breve aos crioprotetores ou através de rápidas taxas de resfriamento (Vajta et al., 1998). As rápidas taxas de resfriamento podem diminuir as injúrias celulares através da passagem direta pela zona perigosa de resfriamento que está entre + 15°C e – 5°C (Martino et al., 1996a).

Diferentes estratégias estão sendo utilizadas para minimizar os danos osmóticos e tóxicos, através da aplicação de crioprotetores menos tóxicos, bem como a combinação de dois ou três crioprotetores (Kasai et al., 1996; Vajta, 2000). Para Denniston et al. (2000) o desempenho dos agentes crioprotetores intracelulares (metanol, DMSO, glicerol, etilenoglicol) pode ser otimizado associando os crioprotetores de ação extracelular (glicose, sacarose, trehalose).

Metanol, dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, etilenoglicol e sacarose são as combinações crioprotetoras mais comumente utilizadas. Todos eles são reportados como sendo moderadamente tóxicos (Harvey, 1983; Robertson & Laurence, 1988). Deste modo, a toxicidade dos crioprotetores limita a concentração que eles podem ser usados e isso limita a eficiência da crioproteção destes agentes (Arakawa et al., 1990).

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos para relatar a toxicidade dos crioprotetores em embriões de peixes (Zhang et al., 1993; Hagedorn et al., 1997a, 1997b e 2000; Chen, 2004); porém muitos deles não trataram da natureza multicompartmental desses embriões (Hagedorn et al., 1998).

Hagedorn et al. (1998) relataram que embriões de “zebrafish” são formados por dois compartimentos celulares, vitelo e blastoderme. Assim os compartimentos celulares com a mais baixa permeabilidade da água e do crioprotetor devem ser considerados e que o sucesso na criopreservação também ocorre quando o dano do crioprotetor a célula é eliminado.

Harvey et al. (1983) examinaram a permeabilidade do glicerol e do DMSO em embriões de “zebrafish” com 50% de epibolia. Eles encontraram que o DMSO permeou em embriões sem córion (descorionificados) e o glicerol e o DMSO, permearam nos embriões intactos. Porém, eles não conseguiram esclarecer a quantidade e a localização da permeação dos crioprotetores. Posteriormente, em experimento com criopreservação, Harvey (1983), observou que o glicerol protegeu somente a blastoderme, e que nenhum crioprotetor foi eficaz para proteger o embrião inteiro a temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Suzuki et al. (1995) em trabalho realizado para observar a relação entre a toxicidade do crioprotetor DMSO e sua concentração em embriões de peixe (carpa, medaka e truta arco-íris), observaram a entrada do DMSO para o espaço perivitelino em alguns tecidos, mas o nível de permeação foi insuficiente para a criopreservação. O mesmo foi observado por Lubzens et al. (1998) trabalhando com carpa japonesa.

Zhang & Rawson (1996) testaram uma variedade de crioprotetores para verificar a permeação destes em embriões de “zebrafish” intactos e descorionificados. Eles verificaram que somente o metanol mostrou uma permeação evidente para dentro do embrião.

Hagedorn et al. (1997a; 1997b) examinaram a multicompartmentalização de embriões de zebrafish usando uma variedade de técnicas que poderiam revelar uma resposta à permeabilidade individual de cada compartimento do embrião. Estes experimentos identificaram que a camada sincicial vitelina é uma barreira para o movimento do crioprotetor para dentro do embrião. Especificamente, pouca ou nenhuma quantidade de DMSO ou propilenoglicol penetrou no vitelo, mas houve permeação do metanol.

Hagedorn et al. (1998) identificaram a existência e a localização da barreira de permeabilidade para DMSO e propilenoglicol, quantificando os parâmetros de

permeabilidade da água e do soluto para o vitelo e a blastoderme. Dois métodos foram utilizados para estimar os parâmetros de permeabilidade. O primeiro mediu a mudança volumétrica da entrada do crioprotetor através do microscópio ótico, e o segundo, analisou a entrada do crioprotetor através do espectroscópio de ressonância magnética nuclear. Este estudo verificou que o principal local de dano letal do crioprotetor poderia ocorrer dentro do compartimento do vitelo, desta forma sem uma crioproteção suficiente dentro do vitelo, ocorre a formação de cristais de gelo, danificando o embrião.

Neste mesmo estudo Hagedorn et al. (1998) observaram que os danos causados pelo crioprotetor aos embriões do tratamento controle, que não foram submetidos ao congelamento, foi baixo ou nenhum dano ocorreu a blastoderme, vitelo e camada sincicial vitelina após o tratamento com crioprotetor, apresentando estruturas celulares intactas e a morfologia dos embriões normais. Em contraste, os embriões congelados exibiram alteração morfológica da camada sincicial vitelina, que após a descongelação muitas organelas e a membrana celular foram destruídas, conservando apenas alguns núcleos com cromatina condensada ou inativa e a membrana nuclear não estava sempre intacta. Morfologicamente o vitelo não foi afetado pela congelação, permanecendo com suas membranas intactas e seu conteúdo aparentemente normal, concluindo que o dano dentro do vitelo ao crioprotetor pode ser tolerado.

Zhang et al. (1993) trabalhando com embriões de “zebrafish” no estágio de gástrula (7h), organogênese (24h) e pré-eclosão (49h), utilizando metanol, DMSO ou etanodiol, observaram que na concentração de 2M com os crioprotetores metanol (5h) e DMSO (2h) houve um desenvolvimento normal dos embriões no estágio de organogênese. O crioprotetor etanodiol (1h) a 2M foi o mais prejudicial, ocorrendo morte dos embriões após o tratamento; para o tratamento controle, para os crioprotetores metanol e DMSO as porcentagens de eclosão foram  $83,5 \pm 11,6\%$ ;  $68,4 \pm 8,8\%$  e  $4,4 \pm 5,8\%$ , respectivamente.

Trabalho realizado por Streit et al. (2007) com embriões de pacu em estágio de pós-gástrula, submetidos a diferentes protocolos de resfriamento, observaram a toxidez do crioprotetor etilenoglicol onde os embriões submetidos ao tratamento controle, em que se utilizou apenas água sem crioprotetor, tiveram taxa de eclosão maior (6%) em relação àqueles embriões expostos ao etilenoglicol (0%). De acordo com estes autores, a não-ocorrência de eclosão nos tratamentos com o etilenoglicol pode estar relacionada a interferência desse crioprotetor no metabolismo do embrião, provocando

desestruturação celular e, conseqüentemente, morte. De acordo com Kusuda et al. (2002), a susceptibilidade dos embriões ocorre em função da degeneração celular e das proteínas da membrana nuclear, em virtude da desidratação e aumento na concentração salina decorrentes do contato com o crioprotetor.

## **2.5) Descongelação e Sensibilidade ao frio**

O procedimento de retirada do crioprotetor durante a descongelação ocorre devido a entrada da água para dentro da célula e conseqüente saída do crioprotetor. De acordo com Shneider & Mazur (1984) a diluição do crioprotetor tem como função evitar a entrada muito rápida de água na célula, pois uma redução drástica na osmolaridade levaria a lise celular. Este fenômeno pode ser assegurado pela adição de altas concentrações de compostos extracelulares, como a sacarose e trehalose ao meio de diluição.

A sacarose atua como um tampão osmótico, mantendo constante a concentração do meio extracelular, regulando a velocidade de entrada e saída do crioprotetor no embrião, evitando o choque osmótico (Leibo, 1984).

O estágio de desenvolvimento embrionário dependente da sensibilidade ao frio tem sido reportado para muitas espécies de embriões, incluindo truta arco-íris (Maddock, 1974; Haga, 1982), “fathead minnows” (Begovac, 1986), carpa (Jaoul & Roubaud, 1982; Magnus, 1996; Roubaud et al., 1985), “zebrafish” (Zhang & Rawson 1995; Hagedorn et al., 1997) e “goldfish” (Liu et al., 1993). A maioria desses estudos revelou que os embriões em estágio de pós-gastrulação são menos sensíveis as injúrias causadas pelo frio.

Em trabalho realizado por Hagedorn et al. (1997), estes autores demonstraram que a remoção do córion usando a enzima pronase, não alterou significativamente os padrões de sensibilidade ao frio dos embriões de zebrafish.

Streit Jr. et al. (2007) elaboraram um protocolo de resfriamento com embriões de *Piaractus mesopotamicus*, expostos por no mínimo seis horas a -8°C. Estes embriões apresentaram menor sensibilidade ao frio quando foram submetidos a 9% de metanol e 17,1% de sacarose na solução crioprotetora, apresentando taxas de eclosão de larvas de 69,2% em relação ao tratamento controle que foi de 80%.

Tendo em vista o aperfeiçoamento do processo da reprodução artificial e a grande importância da congelação de embriões para o aumento da produção de peixes que

apresentam potencial para a aqüicultura comercial, este trabalho objetivou desenvolver protocolos de uma biotecnologia de criopreservação de embriões de pacu (*P. mesopotamicus*) analisando microscopicamente estes embriões após a aplicação de crioprotetores intracelulares e extracelulares.

### 3. Literatura Citada

- AHAMMAD, M.M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B.B. Hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos stored at 4 and  $-2^{\circ}\text{C}$  in different concentrations of methanol and sucrose. **Theriogenology**, v.60, n.8, p.1409-1422, 2003.
- AHAMMAD, M.M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B.B. The hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos in response to exposure to different concentrations of cryoprotectant at low temperatures. **Cryobiology**, v.44, n.2, p.114-121, 2002.
- ALBUQUERQUE, M.O.; BEZERRA e SILVA, J.W. et al. Sobre o desenvolvimento do ovo e embrião do Tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818. Boletim Técnico DNOCS, 1994. 47/52, 1/2:1-240, 79-100.
- ANDRADE-TALMELLI, E.F.; KAVAMOTO, E.T.; ROMAGOSA, E. et al. **Embryonic and larval development of the “piabanha”, *Brycon insignis*, STEINDACHNER, 1876 (PISCES, CHARACIDAE)**. Boletim do Instituto de Pesca, 2001. v.27, n.1, p.21-28.
- ARAKAWA, T. et al. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: A hypothesis. **Cryobiology**, v.27, p.401-415, 1990.
- BALINSKY, B.I. **An introduction to embryology**. Philadelphia: saunders Company, 1970.
- BALLOU, J.D. Potential contribution of cryopreserved germ plasm to the preservation of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity. **Cryobiology**, v.29, p.19-25, 1992.
- BEGOVA, P.C.; WALLACE, R.C. Vitelline envelop proteins in the pipefish. **Journal of Morphology**, v.193, p.117-133, 1986.
- BEIRÃO, J.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, M.P. et al. Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. **Aquaculture**, v.261, p.897-903, 2006.
- BERNARDINO, G.; FERRARI, V.A. **Efeitos do uso de ração comercial no desempenho do pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 em cativeiro**. Boletim Técnico do CEPTA, Pirassununga, v.2, n.1, p.19-33, 1989.
- BERNARDINO, G.; MELO, J.S.C. **Estimativa do tamanho mínimo da amostra de pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887, em monocultura em viveiros experimentais**. Boletim Técnico do CEPTA, Pirassununga, 1989. v.2, n.1, p.75-89,
- BLAXTER, J.H.S. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. **Nature**, v.172, p.1189-1190, 1953.
- BRITSKI, H.A. **Peixes do Pantanal. Manual de identificação**. Brasília: Embrapa-SPI, 1999.
- CAMARGO, S.G.O.; POUHEY, J.L.O.F. Aquicultura um mercado em expansão. **Revista Brasileira de Agrociências**, v.11, p.393-396, 2005.
- CAROLSFELD, J. et al. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, v.63, n.2, p.472-489, 2003.

- CARTER, C.A.; WOURMS, J.P. Cells behaviour during early development in the South American annual fishes of the genus *Cynolebias*. **Journal of Morphology**, v.210, p.247-266, 1991.
- CASTAGNOLLI, N.; DONALDSON, M.E. Induced ovulation and rearing of the pacu, *Colossoma mitrei*. **Aquaculture**, v.25, n.2, p.275-279, 1981.
- CASTAGNOLLI, N.; ZUIM, S.M.F. **Consolidação do conhecimento adquirido sobre o pacu, *Colossoma mitrei* – Berg, 1895**. Boletim Técnico do CEPTA, v.5, p.1-2, 1985.
- CASTELLANI, L.R.; TSE, H.G.; LEME DOS SANTOS, H.S. et al. Desenvolvimento embrionário do curimatá (*P. lineatus*) (VALENCIENNES, 1836), **Revista Brasileira de Ciências Morfológicas**, v.11, n.2, p.99-105, 1994.
- CECCARELLI, P.S. et al. **Observações sobre a ocorrência de parasitos no CEPTA entre 1983 e 1990**. Boletim Técnico do CEPTA, 1990, v.3, n.1, p.43-54.
- CECCARELLI, P.S. **Susceptibilidade à infestação de *Lernaea copepoda* (Lernaeidae, Linnaeus) em diferentes espécies de peixes cultivados no CEPTA e testes de infestação do pacu *Piaractus mesopotamicus* em laboratório**. Boletim Técnico do CEPTA, 1988, v.1, n.2, p.31-36.
- CHABALIN, E.; NEVES, E.M. **Análise econômica da criação de pacu sob condições de risco**. Boletim Técnico do CEPTA, 1996, v.9, n.1, p.53-60.
- CLOUD, J.G. Cryopreservation of sperm of steelhead rainbow trout after refrigerated storage. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. **Cryopreservation in aquatic species**. World Aquaculture Society: Baton Rouge. 2000, cap.3, p.101-103.
- CHEN, S.L.; REN, G.C.; SHA, Z.X. Establishment of a continuous embryonic cell line from Japanese flounder *Palichthys olivaceus* for virus isolation. **Disease aquatic organization** v.60, p.241-246, 2004.
- DENNISTON, R. et al. Principles of cryopreservation. In. TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. **Cryopreservation in aquatic species**. World Aquaculture Society: Baton Rouge. 2000, cap.2, p.59-74.
- DINNYÉS, A.; URBÁNYI, B.; BARANYAI, B. et al. Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants: work in progress. **Theriogenology**, v.50, p.1-13, 1998.
- DOBRINSKY, J.R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. **Theriogenology**, v.57, p.285-302, 2002.
- DOBRINSKY, J.R. Cellular approach to cryopreservation of embryos. **Theriogenology**, v.45, p.17-26, 1996.
- FAO [2007], **Aquaculture statistic 2007**. Disponível em: <<http://www.fao.org>> Acesso em: 11/11/2007.
- GANECO, L.N. **Análise dos ovos de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) (Valenciennes, 1894), durante a fertilização e o desenvolvimento embrionário, sob condições de reprodução induzida**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2003. 78p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, 2003.

- GÉRY, J. Notes des Characologie néotropical.1. Progrès dans la systématique des genres *Colossoma* et *Piaractus*. **Revue Française d'Aquariologie**, v.12, n.4, p.97-102, 1986.
- GODINHO, H.P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicados a aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira e Reprodução Animal**, v.31, n.3, p.351-360, 2007.
- GONCALVES, F.D.; URBINATI, E.C. Growth and metabolic stores of pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg), as affected by fasting and type of diet. **Scientia Agricola**, 2005.
- HAGA, Y. On the subzero temperature preservation of fertilized eggs of rainbow trout **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v.48, p.1569–1572, 1982.
- HAGEDORN, M. et al. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option. **Cryobiology**, v.49, n.2, p.181-189, 2004.
- HAGEDORN, M. et al. Water distribution and permeability of zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. **Journal Experimental Zoology**, v.278, p.356-371, 1997.
- HAGEDORN, M.; HSU, E.; KLEINHANS, F.W. et al. New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation. **Cryobiology**, v.34, p.335-347, 1997a.
- HAGEDORN, M.; HSU, E.W.; PILATUS, U. et al. Magnetic resonance microscopy and spectroscopy reveal kinetics of cryoprotectant permeation in a multicompartimental biological system. **Proceedings National Academy Sciences**, v.93, p.7454-7459, 1996.
- HAGEDORN, M.; KLEINHANS, F.W.; ARTMOV, D. et al. Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo. **Biology of Reproduction**, v.59, p.1240-1250, 1998.
- HAMAZAKI, T. IUCHI, I.; YAMAGAMI, K. A spawning female-specific substance reactive to antichorion (egg envelope) glycoprotein antibody in the teleost, *Oryzias latipes*. **Journal Experimental Zoology**, v. 235, p. 269-279, 1985.
- HARVEY, B. Cooling of embryonic cells, isolated blastoderms, and intact embryos of the zebrafish *Brachydanio rerio* to minus -196 Celsius. **Cryobiology**, v.20, n.5, p.440-447, 1983.
- HARVEY, B.; ASHWOOD-SMITH, M.J. Cryoprotectant penetration and supercooling in the eggs of Salmonid fish. **Cryobiology**, v.19, p.29-40, 1982.
- HISAOKA, K.K.; FIRLIT, C.F. Further studies on the embryonic developmental of the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton Buchanan). **Journal of Morphology**, v.107, p.205-225, 1960.
- IBAMA. **Estatística da pesca 2005**: Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Brasília: IBAMA, 2007. 137p.
- JANIK, M.; KLEINHANS, F.W.; HAGEDORN, M. Overcoming a permeability by microinjecting cryoprotectants into zebrafish embryos (*Brachidanio rerio*) **Cryobiology**, v.41, p.25-34, 2000.
- JAOUL, A.; ROUBAUD, P. Resistance de l'oeuf de carp commune (*Cyprinus carpio* L. Cyprinidae) a des chocs thermiques chauds ou froids. **Canadian Journal Zoology**, v.60, p.3409-3419, 1982.

- KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.67-75, 1996.
- KIMMEL, C.B.; BALLARD, W.W.; KIMMEL, S.R. et al. Stages embryonic developmental of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v.203, p.253-310, 1995.
- KUSUDA, S.; TERANISHI, T.; KOIDE, N. Cryopreservation of chum salmon blastomeres by the straw method. **Cryobiology**, v.45, n.1, p.60-67, 2002.
- LANDINEZ, M.A.; SENHORINI, J.A.; SANABRIA, A.I. et al. Desenvolvimento embrionário de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Boletim Técnico do CEPTA, 2004. v.17, p.1-12.
- LEIBO, S.P. A one-step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**, v.21, p.767-790, 1984.
- LEUNG, L.K.P.; JAMISON, B.G.M. Live preservation of fish gametes. In: **Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa**. Cambridge Univ. Press, 1991.
- LIMA, C.L.B.F. et al. **Ocorrência de acantocéfalos parasitando o pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Pisces, Serrasalminidae) em piscicultura**. Boletim Técnico do CEPTA, 1989, v.2, n.1, p.43-51.
- LIMA, R.V.A. et al. **Tecido germinativo ovariano e ciclo reprodutivo de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) mantidos em cativeiro**. Boletim Técnico do CEPTA, 1991, v.4, n.1, p.1-46.
- LIU, K.; CHOU, T.; LIN, H. Cryosurvival of goldfish embryos after subzero freezing. **Aquatic Living Resources**, v.6, p.145-153, 1993.
- LOPES, R.N.M.; SENHORINI, J.A.; SOARES, M.C.F. **Desenvolvimento embrionário e larval do matrinxã *Brycon cephalus* GUNTHER, 1869, (PISCES, CHARACIDAE)**. Boletim Técnico do CEPTA, 1995. v.8, p.25-39.
- LUBZENS, E.; AMOS, A.; MAGNUS, Y. Steps towards cryopreservation of Japanese ornamental carp embryos: Sensitivity to low temperatures and permeation of 3H-dimethylsulfoxide (DMSO). **Aquaculture**, 1998.
- LUZ, R.K.; REYNALTE-TATAJE, D.A.; FERREIRA, A.A. et al. **Desenvolvimento embrionário e estágios larvais do mandi-amarelo *Pimelodus maculatus***. Boletim do Instituto de Pesca, 2001. v.27, n.1, p.49-55
- MADDOCK, B.G. A technique to prolong the incubation period of brown trout ova. **Progressive Fish-culturist**, v.36, p.219-222, 1974.
- MARTINEZ, A.G., VALCÁRCEL, A., de las HERAS, M.A., de MATOS, D.G., et al. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: in vitro and in vivo evaluations. **Animal Reproduction Science**, v. 73, p. 11-21, 2002.
- MARTINO, A., POLLARD, J.A., LEIBO, S.P. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. **Molecular Reproduction Development**, v.45, p.503-512, 1996a.
- MATKOVIC, M.V., CUSSAC, V.E., CUKIER, M. et al. Desarrollo embrionario de *Rhamdia sapo* (VALENCIENNES, 1840) EIGENMANN Y EIGENMANN, 1888 (PISCES, PIMELODIDAE). I. Segmentación, morfogénesis y organogenesis temprana. **Revista Brasileira de Biologia**, v.45, n.1/2, p.39-50, 1985.

- MAZUR, P. Freezing of living cells: Mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**, v.247, p.125-142, 1984.
- MAZUR, P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. **Journal of General Physiology**, v.47, p.347-369, 1963.
- MILIORINI, A.B. et al. Resfriamento do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) à 4°C, utilizando diferentes concentrações de dimetilsulfóxido. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.209-211, 2002.
- NAKATANI, K. et al. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: EDUEM, 2001, 378p.
- NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, v.35, p.109-124, 1991.
- NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A.; Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme, Prochilodontidae). **Zygote**, v.14, p.217-229, 2006.
- PAPADOPOULOS, S.; RIZOS, D.; DUFFY, P. et al. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, *in vivo* or *in vitro* produced ovine blastocysts. **Animal Reproduction Science**, v.74, p.35-44, 2002.
- PEZZATO, L.E. et al. Alevinos de pacu *Piaractus mesopotamicus* arraçoados com diferentes níveis de gordura animal e vegetal. In: ENCONTRO SULBRASILEIRO DE AQUICULTURA, 3, 1995, Ibirubá. **Anais...** Ibirubá: UFRGS, 1995. p.154-161.
- QUEIROZ, J.F.; LOURENÇO, J.N.P.; KITAMURA, P.C. A EMBRAPA e a aquicultura: demandas e prioridades de pesquisa. Brasília: Embrapa Informações Tecnológica, 2002.
- RALL, W.F. Cryopreservation of oocytes and embryos: Methods and applications. **Animal Reproduction Science**, v.28, p.237-245, 1992.
- RALL, W.F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, v.24, p.387-402, 1987.
- RANA, K. Preservation of gametes. In: BROMAGE, N.R.; ROBERTS, R.J. (Eds.) **Broodstock management and egg and larval quality**. London: Blackwell Science, 1995. p.53-75.
- RIBEIRO, C.R.; SANTOS, H.S.L.; BOLZAN, A.A. Estudo comparativo da embriogênese de peixes ósseos (pacu, *Piaractus mesopotamicus*; tambaqui, *Colossoma macropomum* e híbrido tambacu). **Revista Brasileira de Biologia**, v.55, p.65-78, 1995.
- ROBERTSON, S.M.; LAURENCE, A.L. 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**, v.50, n.3, p.148-154, 1988.
- ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M.Y. Desenvolvimento e diferenciação dos ovócitos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Osteichthyes, Characidae). **Acta Scientiarum**, v.24, n.2, p.433-438, 2002.
- ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M.Y.; FENERICH-VERANI, N. **Stages embryonic development of the “matrinxã”, *Brycon cephalus* (PISCES, CHARACIDAE)**. Boletim do Instituto de Pesca, 2001, v.27, n.1, p.27-32.

- ROMAGOSA, E.; PAIVA, P.; CESTAROLLI, M.A. et al. Reprodução induzida do pacu *Colossoma mitrei* Berg, 1895, mantidos em condições de cultivo intensivo. **Ciência e Cultura**, v.37, n.7, p.849, 1985.
- ROMAGOSA, E.; PAIVA, P.; GODINHO, H.M. et al. Desenvolvimento dos ovócitos de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (= *Colossoma mitrei* Berg, 1895) em condições de cultivo intensivo. **Ciência e Cultura**, v.40, n.1, p.60-64, 1988.
- ROUBAUD, P.; CHAILLOU, C.; SJAFELI, D. Variations cycliques de la tolerance a un thermique froid appliqué au cours de la segmentation de lembryon de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.). **Canadian Journal of Zoology**, v.63, p.657-663, 1985.
- SCHNEIDER, V.; MAZUR, P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. **Theriogenology**, v.21, p.68-79, 1984.
- SENHORINI, J.A. et al. **Larvicultura e alevinagem do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), tambaqui *Colossoma macropomum* (Curvier, 1818) e seus respectivos híbridos.** Boletim Técnico do CEPTA, v.1, n.2, p.19-30, 1988.
- SILVA, J.A. et al. Utilização de extrato cru de hipófise de frangos (*Gallus domesticus*) como indutor de desova em Curimatá (*Prochilodus scrofa*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, n.1, p.30-32, 1997.
- STOSS, J.; DONALDSON, E. M. Studies on cryopreservation of eggs from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Aquaculture**, v.31, p.51-65, 1983.
- STREIT Jr., D.P. **Crioprotetores e resfriamento de embriões de pacu (*P. mesopotamicus*).** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2005. 75p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, 2005.
- STREIT Jr., D.P. et al. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. **Arquivos de Medicina Veterinária e Zoologia da UNIPAR**, v.7, n.2, p.157-162, 2005.
- STREIT Jr., D.P. et al. Avaliação do sêmen de *Piaractus mesopotamicus* induzidos com extrato de hipófise de frango e coelho. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39, 2002, Recife. **Anais...** Recife: UFRPE, (CD-ROM) 2002.
- STREIT Jr., D.P. et al. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.8, p.1199-1202, 2007.
- SUZUKI, T. et al. Relation between toxicity of cryoprotectant Me<sub>2</sub>SO and its concentration in several fish embryos. **Fisheries Science**, v.61, n.3, p.193-197, 1995.
- TRINKAUS, J.P. Mechanism of *Fundulus* epiboly – a current review. **American Zoology**, v.24, p.673-688, 1984.
- VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.357-364, 2000.

- VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M. et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, p.53-58, 1998.
- WESTERFIELD, M. **The zebrafish book. A guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Brachydanio rerio*)** Eugene, OR: University of Oregon Press, 1983.
- WHITTINGHAM, D.G. Principles of embryo preservation. In: ASWOOD-SMITH MJ, FARRANT J. (Eds). **Low temperature preservation in medicine and biology**. Tumbidge: Pitman Medical, 1980, p.65-83.
- WILDT, D.E. Reproductive research in conservation biology: priorities and avenues for support. **Journal of Zoology and Wildlife Medicine**, v.4, n.20, p.391-5, 1989.
- WILDT, D.E.; SEAL, U.S.; RALL, W.F. Genetic resource banks and reproductive technology for wildlife conservation. In: **Genetic Conservation of Salmonid Fishes. (J. G. Cloud and G. H. Thorgaard, Eds.)**, 1993, p.159-173.
- ZANIBONI, F.E. Utilização do LHRH-a para indução à espermiacão e desova do pacu-caranha *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Biotemas**, v.8, n.1, p.36-45, 1995.
- ZELL SR. Cryopreservation of gametes and embryos of salmonid fishes. **Annual Biology Animal Biochemistry Biophysical**, v.18, p.1089-99, 1978.
- ZHANG, T.; RAWSON, D.M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology**, v.32, p.239-246, 1995.
- ZHANG, T.; RAWSON, D.M. Studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology**, v.33, p.1-13, 1996.
- ZHANG, T.; RAWSON, D.M.; MORRIS, G.J. Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Aquatic Living Resources**, v.6, p.145-153, 1993.

## **OBJETIVOS GERAIS**

Este trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver uma metodologia de criopreservação de embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após exposição aos crioprotetores intracelulares e extracelulares.

Analisar as injúrias causadas em embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos às técnicas de congelamento e descongelamento após exposição aos crioprotetores intra e extracelulares.

## **CAPÍTULO 2**

Utilização de crioprotetores intra e extracelulares na preservação morfológica de embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

**Utilização de crioprotetores intra e extracelulares na preservação morfológica de embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*).**

**RESUMO:** Embriões de *P. mesopotamicus* foram expostos por 10 minutos a ação dos crioprotetores metanol e etilenoglicol, nas concentrações, 7%, 10% e 13%, e a adição de um crioprotetor extracelular, a sacarose 0,1 M. Após a exposição foram processados 10 embriões em historesina e avaliou-se a preservação morfológica de acordo com três categorias para as características: córion, vitelo, camada sincicial vitelina e camadas germinativas. Os crioprotetores utilizados não alteraram a preservação do córion. A sacarose teve efeito significativo sobre a preservação do vitelo quando comparada aos crioprotetores intracelulares. Maior acidofilia dos grânulos de vitelo indica efeito positivo apenas com a utilização de sacarose e interação do crioprotetor intracelular e sacarose. Houve efeito positivo com a utilização da sacarose para as características de número e tamanho dos núcleos presentes na camada sincicial vitelina, com efeito significativo da interação crioprotetor intracelular e sacarose sobre o tamanho dos núcleos. O crioprotetor intracelular etilenoglicol permitiu maior diferenciação das camadas germinativas comparado ao metanol, mas não houve diferença significativa de utilização da sacarose. A associação do etilenoglicol na concentração de 7% com a sacarose mostrou ser a melhor combinação de crioprotetores para preservação do vitelo e camadas germinativas de *Piaractus mesopotamicus*.

**Palavras-chave:** etilenoglicol, metanol, preservação embrionária, sacarose, vitelo

**Utilization of intra and extracellular cryoprotectants for morphology preservation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos.**

**ABSTRACT:** Embryos of *P. mesopotamicus* were exposed for 10 minutes to the action of methanol and ethylene glycol cryoprotectors, in concentrations of 7%, 10% and 13% with the addition of an extracellular cryoprotector, the sucrose 0,1 M. After the exposure of 10 embryos were processed in historesin and the morphologic preservation was evaluated in agreement with three categories considering the characteristics: chorion, yolk, yolk syncytial layer and germ layers. The used cryoprotectors did not alter the chorion preservation. The sucrose had significant effect on the yolk preservation when compared to the intracellulares cryoprotectors. The higher acidophilia of the yolk granules indicate a positive effect only when the sucrose was used and interaction of the cryoprotector intracellular and sucrose. There was positive effect with the sucrose use for the characteristics of number and size of the nuclei present in the yolk syncytial layer with significant effect of the interaction among intracellular cryoprotector and sucrose on the nuclei size. The intracellular cryoprotector ethylene glycol allowed a higher differentiation of the germ layers when compared to the methanol, but there was not any significant difference in using sucrose. The association of the ethylene glycol in the concentration of 7% with the sucrose, showed the best cryoprotectors combination to the preservation of the yolk and germ layers of *Piaractus mesopotamicus*.

**Key words:** ethylene glycol, methanol, embryonic preservation, sucrose, yolk

## Introdução

Observando as qualidades do pacu (*Piaractus mesopotamicus*), em meados dos anos setenta, pesquisadores começaram a desenvolver pacotes tecnológicos para o cultivo dessa espécie, visto que a mesma não se reproduz naturalmente em ambientes confinados, necessitando ser induzida a reprodução através de agentes hormonais, a fim de obter sucesso na reprodução (Lima et al., 1991). De acordo com dados do IBAMA (2004), o pacu é a segunda espécie nativa mais cultivada no Brasil, deste modo, novas tecnologias podem contribuir diretamente com a produção dessa espécie.

O desenvolvimento de uma tecnologia de criopreservação assim como resfriamento de embriões de *Piaractus mesopotamicus* foram descritas por Streit Jr. (2005) e Streit Jr. et al. (2007), respectivamente.

Para o desenvolvimento de um protocolo de resfriamento ou criopreservação, soluções crioprotetoras são indispensáveis de modo a submeter os embriões a temperaturas abaixo de 0°C (Beirão et al., 2006). O funcionamento do crioprotetor está relacionado aos processos de entrada de crioprotetor e saída da água na pré-congelação, entretanto no descongelamento este processo é inverso (Schneider & Mazur, 1984). Diferentes estratégias são utilizadas para minimizar os danos osmóticos e tóxicos, através da aplicação de crioprotetores menos tóxicos, bem como a combinação de dois ou três crioprotetores (Vajta, 2000; Streit Jr. et al., 2007). Para Denniston et al. (2000) o desempenho dos agentes crioprotetores intracelulares pode ser otimizado associando os crioprotetores de ação extracelular.

Avaliamos neste trabalho a preservação morfológica de embriões e estruturas extra-embriônicas de pacu (*P. mesopotamicus*) após exposição aos crioprotetores intracelulares metanol e etilenoglicol e a sacarose como crioprotetor extracelular. Esta avaliação foi realizada em cortes ultrafinos de embrião sendo proposta uma classificação para indicar diferentes níveis de preservação morfológica embrionária\*.

---

\* Para este estudo, considerou-se o termo “embrião” = embrião (camadas germinativas) + estruturas extra-embriônicas. Estruturas extra-embriônicas relacionadas ao embrião: córion, vitelo e camada sincicial vitelina.

## Material e Métodos

### *Local*

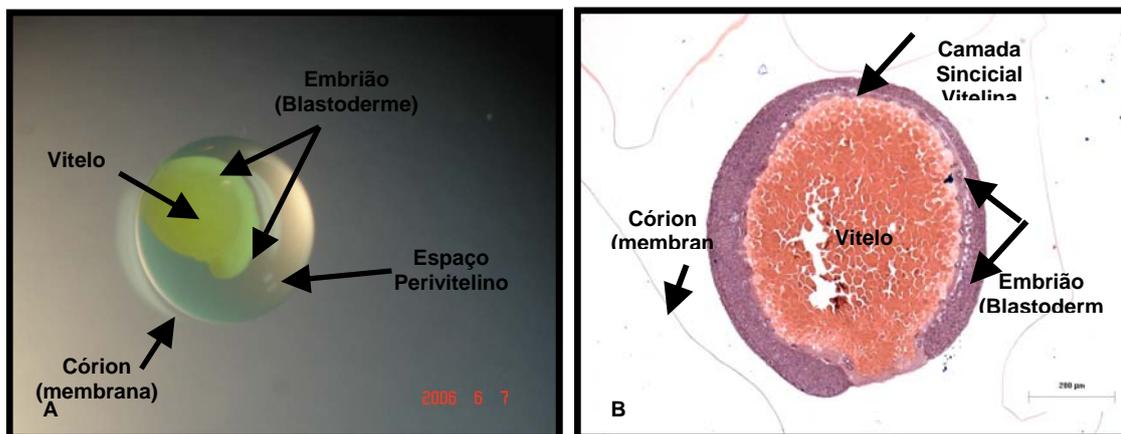
Este estudo desenvolveu-se na Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Maringá- UEM/CODAPAR e na Estação de Hidrologia e Aqüicultura da Duke Energy International- Geração Paranapanema, em Salto Grande (SP), Laboratório de Histotécnica Animal do Departamento de Ciências Morfofisiológicas da UEM, de novembro de 2005 até novembro de 2007.

### *Animais e experimento*

Foram utilizados 10 machos e 10 fêmeas de pacu (*P. mesopotamicus*), com idade de quatro anos selecionados do plantel de reprodutores da Duke Energy, quando apresentavam características reprodutivas secundárias de peixes migradores, como abdômen abaulado e macio, orifício urogenital avermelhado e intumescido e os machos liberavam sêmen com uma leve compressão no abdômen.

Após a seleção os animais foram submetidos a indução hormonal através de aplicações hormonais intramusculares, entre a nadadeira dorsal e a linha lateral. Ministrou-se 2,5 e 5,5 mg de extrato de hipófise de carpa/Kg de peso vivo de peixe, para machos (dose única) e fêmeas (duas doses, 10% na primeira e 90% na segunda), respectivamente. Foram coletados ovócitos de 10 fêmeas de pacu, os quais foram fertilizados com “pool” de sêmen. Após a fertilização, os ovos foram colocados em incubadoras do tipo vertical, ligadas a um sistema fechado de água com temperatura controlada de 27,7°C.

Quando 80% dos ovos apresentavam-se em estágio de fechamento do blastóporo com 90% de epibolia (aproximadamente nove horas de incubação) (figura 1), observados em estereomicroscópio, colheu-se uma alíquota de aproximadamente 1500 ovos viáveis da incubadora, sendo descartados os ovos gorados (esbranquiçados). Após a drenagem do excesso de água com uma peneira, os ovos foram mergulhados nas soluções crioprotetoras, previamente preparadas. Para cada tratamento foram utilizadas amostras de 10 embriões em média, com córion.



Figuras 1 - Indicação dos componentes embrionários e extra-embrionários de pacu (*P. mesopotamicus*). A- Imagem obtida a partir de estereomicroscópio. B- Fotomicrografia do embrião em estágio de fechamento do blastóporo H.E (10x).

### *Soluções crioprotetoras*

As soluções crioprotetoras testadas foram o metanol e etilenoglicol, em três concentrações (7, 10 e 13%) e a adição de um crioprotetor extracelular, a sacarose 0,1M (Zhang & Rawson, 1995). Todos os embriões foram expostos as soluções crioprotetoras durante 10 minutos.

Para as soluções crioprotetoras, metanol e etilenoglicol, nas três concentrações, preparou-se previamente uma diluição para 50 mL em béquer, devidamente identificados, em uma temperatura média de  $27,5 \pm 1^\circ\text{C}$ . Assim, foi repetido para todos os tratamentos e também para o tratamento controle que continha apenas água destilada e para o tratamento que continha água e sacarose (Figura 2).

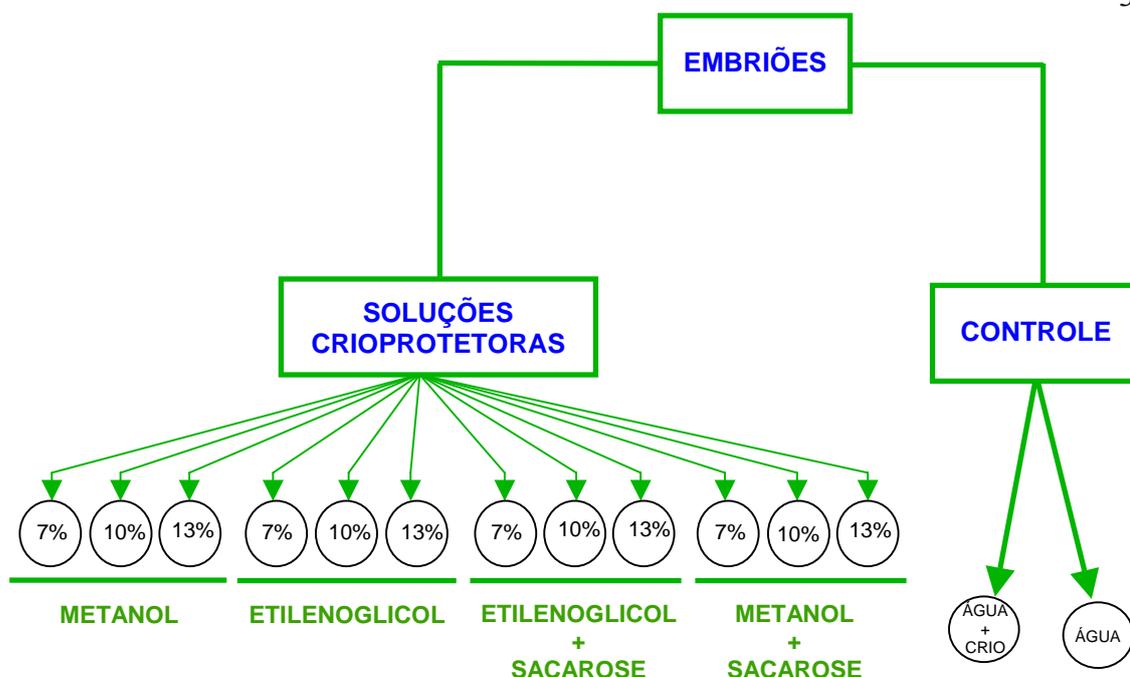


Figura 2. Esquema dos tratamentos que os embriões de pacu (*P. mesopotamicus*), em estágio de fechamento do blastóporo, foram submetidos, durante 10 minutos, em soluções crioprotetoras intracelulares, metanol e etilenoglicol em diferentes concentrações, e o crioprotetor extracelular sacarose 0,1M.

#### ***Avaliação morfológica dos embriões***

Após o tempo de exposição aos crioprotetores (Figura 2) a solução foi drenada e os embriões mergulhados em solução fixadora “Bouin” e em seguida estes foram incluídos em resina 2-hidroxietilmetacrilato (*Leica Historessin*) sendo processados 10 embriões/tratamento, seccionados de forma seriada com 3µm de espessura (seis cortes/embrião) corados pelo método de hematoxilina-eosina.

A análise morfoquantitativa embrionária foi realizada no Laboratório de Histotécnica Animal do Departamento de Ciências Morfofisiológicas-UEM, com auxílio de microscópio óptico Olympus CBA e as imagens obtidas através de uma câmara de alta resolução Olympus Q-COLOR 3, acoplada ao microscópio Olympus Bx41.

Com o objetivo de detectar possíveis alterações morfológicas embrionárias após exposição aos crioprotetores foi adotada a seguinte escala:

embrião pouco preservado.....	1
embrião moderadamente preservado.....	2
embrião preservado.....	3

## 1. Preservação do córion

- presença de uma coloração e rompido.....1
- presença de duas cores e rompido; presença de uma cor e sem rompimento.....2
- presença de duas cores ou predomínio e sem rompimento.....3

## 2. Características do vitelo

### 2.1. Preservação estrutural

- muitas falhas, extravasado para fora do embrião e/ou sem vitelo.....1
- com falhas, aberturas ou rachaduras no vitelo de tamanho médio ou grande.....2
- ausência de falhas, vitelo bem fechado e uniforme.....3

### 2.2. Acidofilia dos grânulos

- presença exclusiva da coloração rósea escuro, vitelo acidófilo.....1
- presença das duas colorações.....2
- presença exclusiva da coloração rósea claro.....3

## 3. Camada Sincicial Vitelina (característica nuclear )

### 3.1. Número de núcleos

- presença de 0 a 14 núcleos.....1
- presença de 15 a 29 núcleos.....2
- presença de 30 núcleos ou acima desse valor.....3

### 3.2. Formato nuclear

- forma cúbica e/ ou irregular.....1
- forma cúbica, pavimentosa e irregular.....2
- forma pavimentosa.....3

### 3.3. Tamanho dos núcleos

- menor tamanho em relação ao núcleo dos blastômeros.....1
- tamanho médio em relação ao núcleo dos blastômeros.....2
- tamanho grande em relação ao núcleo dos blastômeros.....3

#### 4. Camadas Germinativas (grau de diferenciação celular)

- presença das células profundas.....1
- presença de epiblasto, hipoblasto e células em involução .....2
- presença da notocorda, mesoderma paraxial e/ou somitos.....3

#### *Análise dos dados*

O Delineamento Experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em um fatorial de 2x2x3, sendo dois crioprotetores intracelulares, metanol e etilenoglicol em três concentrações (7, 10 e 13%) com inclusão ou não do crioprotetor sacarose (0,1M).

As características do embrião foram avaliadas segundo três categorias, ou seja, para cada característica foi escolhida uma resposta entre três alternativas. Tais dados são característicos da distribuição multinomial, a qual é pertencente a classe de modelos baseados na família exponencial, permitindo a abordagem dos Modelos Lineares Generalizados - MLG (Nelder & Wedderburn, 1972; Myers et al., 2002) nas análises. Nessa metodologia, ao contrário dos métodos de transformação matemática para a normalização dos dados, a natureza da distribuição dos dados é incorporada, e a transformação se dá apenas no componente sistemático do modelo, aumentando o poder do teste. A função de ligação utilizada foi a *cumulative logit* a canônica (função natural) para modelos com distribuição multinomial.

Por meio do procedimento PROC GENMOD do programa SAS efetuou-se a análise de deviance (ANODEV) uma generalização da ANOVA para Modelos Lineares Generalizados.

Cada característica analisada foi composta de dez repetições, as quais foram submetidas aos crioprotetores metanol ou etilenoglicol, em três concentrações diferentes, mais o nível zero e, com ou sem a utilização de sacarose. No entanto, o modelo que foi utilizado para comparar diferenças significativas de crioprotetor, não incluiu o nível zero. Assim, o modelo encontrado como o mais ajustado para acomodar esses efeitos foi o que segue:

$$Y_{ijkl} = \mu + s_i + c_j + cxs_{ij} + d_k(c_j) + e_{ijkl},$$

onde:

$Y_{ijkl}$  é o valor da observação do embrião;

$\mu$  é o intercepto ou a média geral;

$s_i$  é o efeito fixo de utilização da sacarose;

$c_j$  é o efeito fixo de crioprotetor;

$cxs_{ij}$  é o efeito fixo de interação entre utilização de sacarose  $i$  e crioprotetor  $j$ ;

$d_k(c_j)$  é o efeito da concentração  $k$  de crioprotetor aninhado dentro do efeito de crioprotetor; e

$e_{ijkl}$  é o efeito aleatório residual.

Para as variáveis resposta em que o efeito de concentração aninhado dentro de crioprotetor foi significativo foi realizada uma análise de estimação dos parâmetros da regressão multinomial logística, separadamente para cada crioprotetor, por meio do mesmo procedimento PROC GENMOD. Os valores preditos foram utilizados para a construção das equações de regressão e os resultados médios plotados em gráficos.

Por meio desses parâmetros estimados, foi possível obter as equações generalizadas da regressão logística, na seguinte forma:

$$\hat{P} = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 \times dose}}{[1 + e^{\beta_0 + \beta_1 \times dose}]}$$

sendo:

$\hat{P}$  a probabilidade de uma dada categoria (1, 2 ou 3);

$\beta_0$  o intercepto;

$\beta_1$  o coeficiente do efeito da concentração.

## Resultados e Discussão

As médias aritméticas (na escala multinomial) das características morfológicas indicativas de preservação embrionária após o tratamento com os crioprotetores, com as respectivas comparações realizadas, de acordo com as análises de *deviance* (Tabelas 2, 3, 4, 5, 6 e 7) encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Médias e desvios padrões para as características de preservação embrionária: córion (CO), preservação do vitelo (VITP), acidofilia dos grânulos de vitelo (VITG), quantidade de núcleos da camada sincicial vitelina (CSVN), formato dos núcleos da camada sincicial vitelina (CSVF), tamanho dos núcleos da camada sincicial vitelina (CSVT) e diferenciação celular da camada germinativa primária (CGP).

VARIÁVEL	CRIOPROTETOR						Média	
	METANOL			ETILENOGLICOL				
CO	c/ sacarose	2,00	(0,0)	Aa	2,00	(0,0)	Aa	2,00
	s/ sacarose	1,92	(0,57)	Aa	1,91	(0,43)	Aa	1,92
	Média	1,96			1,96			
VITP	c/ sacarose	2,00	(0,0)	Aa	2,16	(0,63)	Aa	2,08
	s/ sacarose	1,80	(0,65)	Ab	1,91	(0,53)	Ab	1,86
	Média	1,90			2,04			
VITG	c/ sacarose	1,65	(0,49)	Ab	2,04	(0,46)	Aa	1,85
	s/ sacarose	2,24	(0,44)	Aa	1,91	(0,43)	Aa	2,08
	Média	1,95			1,98			
CSVN	c/ sacarose	2,96	(0,21)	Aa	2,88	(0,45)	Aa	2,92
	s/ sacarose	2,56	(0,58)	Ab	2,81	(0,40)	Ab	2,69
	Média	2,76			2,85			
CSVF	c/ sacarose	1,50	(0,60)	Aa	1,45	(0,72)	Aa	1,48
	s/ sacarose	1,16	(0,47)	Aa	1,76	(0,83)	Aa	1,46
	Média	1,33			1,61			
CSVT	c/ sacarose	2,18	(0,67)	Aa	2,63	(0,50)	Aa	2,41
	s/ sacarose	2,16	(0,75)	Aa	2,00	(0,71)	Ab	2,08
	Média	2,17			2,32			
CGP	c/ sacarose	1,39	(0,66)	Ba	1,95	(0,50)	Aa	1,67
	s/ sacarose	1,57	(0,51)	Ba	1,95	(0,62)	Aa	1,76
	Média	1,48			1,95			

\*Letras maiúsculas mostram diferenças em uma mesma linha e letras minúsculas mostram diferenças em uma mesma coluna, de acordo com ANODEV.

Os resultados obtidos pela análise de *deviance*, que podem ser observados na Tabela 2, indicaram que não houve diferença significativa entre os tratamentos com os crioprotetores metanol e etilenoglicol e o uso da sacarose também não alterou a característica de preservação do córion. Assim, independentemente do crioprotetor utilizado, a preservação do córion foi a mesma para os embriões.

Tabela 2 – Análise de *deviance* para avaliar diferenças significativas entre os crioprotetores metanol e etilenoglicol, com ou sem a utilização de sacarose, para a característica córion.

ANODEV	GL*	Deviance	$\chi^2$	Pr
Intercepto		174,70		
Sac	1	171,52	1,59	0,21
Crio	1	171,52	0,00	0,98
Interação Crio x Sac	1	171,52	0,00	0,98
Conc (Crio)	2	169,57	0,97	0,62

\*GL: graus de liberdade; \*\*\*P<0,01; \*\*P<0,05; Crio: crioprotetores; Sac: sacarose; Con (Crio): concentração de crioprotetor.

A preservação do córion neste estudo, conforme a Tabela 1 mostra média próxima a 2,0. A categoria utilizada para a avaliação microscópica dos embriões para detectar possíveis alterações com média 2,0 representa a presença das duas colorações, róseo e roxo, nesta membrana, podendo apresentar-se rompido ou apenas uma coloração, a rósea ou a roxa e córion sem rompimento.

O córion é a membrana protetora externa, não celular composta principalmente por glicoproteínas (Hamazaki et al., 1985; Begovac, 1986) sendo identificada por Hagedorn et al. (1997) como um dos fatores para o insucesso nos protocolos de criopreservação de embriões de peixes, pois poderia dificultar a entrada e saída da água e dos crioprotetores no embrião (Harvey, 1982).

A permeabilização do córion ou a sua remoção total (descorionificação) tem sido verificada para várias espécies (Iwamatsu et al., 1993; Zhang & Rawson, 1996; Valencia et al., 1996), na tentativa de aumentar a penetração do crioprotetor antes da criopreservação. Estes métodos podem ser tóxicos para os embriões e resultar em uma diminuição na taxa de eclosão ou aumentar o número de larvas não viáveis.

Ninhaus-Silveira et al. (2007) trabalhando com curimatá (*Prochilodus lineatus*) utilizaram embriões descorionificados e observaram que retirando essa membrana protetora os embriões permaneceram viáveis, uma vez que a maioria chegou a fase de eclosão. Estes autores verificaram que embriões de curimatá não necessitam do córion para completar seu desenvolvimento, como acontece em “zebrafish”, tendo este uma função de proteção contra choques mecânicos. Portanto, a preservação desta membrana não pode ser considerada como um fator limitante para o desenvolvimento embrionário e eclosão.

Harvey et al. (1983) trabalhando com embriões de “zebrafish” também utilizaram embriões descorionificados e observaram a permeabilidade dos crioprotetores glicerol e

DMSO. Eles verificaram que o DMSO penetrou em embriões descórionificados e com córion e o glicerol penetrou somente em embriões com o córion. Em trabalhos anteriores Harvey & Ashwood-Smith (1982) constataram que a penetração do metanol foi significativamente mais rápida do que do DMSO e glicerol em embriões de salmonídeo, sendo que houve uma melhor taxa de permeação do metanol, refletido por seu baixo peso molecular, podendo ser considerada uma das características mais desejáveis de um crioprotetor sobre o embrião.

Estes dados corroboram com os encontrados por Zhang & Rawson (1993), onde o metanol utilizado em embriões de “zebrafish” apresentou rápida penetração para dentro do córion. Ainda, Zhang et al. (1993) trabalhando com a mesma espécie e mesmo crioprotetor verificaram altas taxas de eclosão dos embriões tratados com metanol em relação aos embriões tratados com DMSO ou etilenoglicol, possivelmente devido a rápida penetração, como constatado por Zhang & Rawson (1993) e também pela baixa toxicidade do metanol.

Streit Jr. et al. (2007) trabalhando com *P. mesopotamicus* e mesmo tempo de exposição ao crioprotetor, porém utilizando além da sacarose outro crioprotetor externo, a glicose, obteve resultados positivos na interação do crioprotetor sacarose com o metanol, sendo que a combinação com a sacarose foi menos agressiva aos embriões em relação a todas as outras combinações, como verificado pela alta taxa de eclosão neste tratamento (69,2%).

Os açúcares têm importante atuação como solução crioprotetora, que é a manutenção da pressão osmótica (Holt, 2000). A eficiência da sacarose como crioprotetor extracelular em relação a glicose, no trabalho de Streit Jr. et al. (2007) pode estar relacionada ao fato da sacarose, ser um oligossacarídeo, possa ter um efeito adicional de proteção celular sobre outros açúcares de cadeia mais simples, como a glicose, por provocar desidratação nos embriões, evitando a formação de cristais de gelo intracelulares (Rall, 1987).

Em trabalho realizado por Cabrita et al. (2003) no qual foi avaliado o efeito dos tratamentos químico e enzimático, na permeabilização do córion de embriões de “turbot” (*Scophthalmus maximus*) para facilitar a permeação do crioprotetor DMSO, estes autores observaram que houve mudanças volumétricas nos embriões após exposição ao crioprotetor DMSO, observado pelo rápido fluxo da água para fora do córion nos embriões permeabilizados. Os embriões observados por Cabrita et al. 2003,

submetidos à exposição ao DMSO, mostraram uma desidratação imediata, observada pelo seu encolhimento.

Para a característica de preservação do vitelo (VITP), o efeito de utilização da sacarose foi significativo ( $P < 0,05$ ), mas não houve diferença significativa entre a utilização dos crioprotetores metanol e etilenoglicol (Tabela 3). De acordo com a Tabela 1, pode-se observar que o tratamento com a utilização da sacarose teve um efeito positivo sobre a preservação do vitelo em embriões tratados com crioprotetores intracelulares.

Tabela 3 – Análise de *deviance* para avaliar diferenças significativas entre os crioprotetores metanol e etilenoglicol, com ou sem a utilização de sacarose, para a característica de preservação do vitelo.

ANODEV	GL	Deviance	$\chi^2$	Pr
Intercepto		301,01		
Sac	1	291,48	4,77**	0,03
Crio	1	287,57	1,95	0,16
Interação Crio x Sac	1	287,44	0,06	0,80
Conc. (Crio)	2	286,21	0,62	0,73

\*GL: graus de liberdade; \*\*\* $P < 0,01$ ; \*\* $P < 0,05$ ; Crio: crioprotetores; Sac: sacarose; Con (Crio): concentração de crioprotetor.

Possivelmente esse efeito positivo da sacarose deva-se a penetração e concentração suficiente desse crioprotetor externo nos grânulos de vitelo. A grande maioria dos trabalhos com *B. rerio* até hoje sugerem que o maior problema para o tratamento com crioprotetor dessa espécie, principalmente nas fases de epibolia e de formação dos somitos, é o da penetração insuficiente de crioprotetores em todas as partes dos embriões, particularmente no vitelo (Rawson et al., 2000).

A ação positiva da sacarose como crioprotetor para embriões de peixes, sobretudo em soluções que contenham outro crioprotetor intracelular, como o metanol, também tem sido verificada em outras espécies. Ahammad et al. (1998) encontraram alta taxa de sobrevivência com embriões de três espécies de carpa (*Labeo rohita*, *Catla catla* e *Cirrhinus mrigala*) quando estocados a  $-4^{\circ}\text{C}$ , após serem tratados com metanol (3,2; 6,5 e 9,7%), e sacarose (17,1%). Esses autores concluíram que a adição de sacarose a solução de metanol (3,2 e 6,5%) foi essencial para a sobrevivência dos embriões de *C. mrigala*, mas dispensável aos embriões das outras duas espécies de carpa estudadas.

Hagedorn et al. (1998) também observaram resultados positivos na utilização de crioprotetores em embriões de “zebrafish”, observando que não houve dano ao vitelo após o tratamento com as soluções crioprotetoras DMSO e propilenoglicol, as estruturas do vitelo estavam intactas e mostraram morfologia normal, o que foi observado também no presente estudo com metanol e etilenoglicol.

Um dos grandes problemas na permeação dos crioprotetores em embriões de peixes está relacionado ao vitelo. Hagedorn et al. (1997a) demonstraram que o vitelo representa 61% do volume total, apresentando uma grande quantidade de lipídeos, além de ser encontrado 42% do volume de água, o que pode ser um grande impedimento para a permeação dos crioprotetores. Trabalhando com embriões de suínos, Nagashima et al. (1995) relataram que a remoção de lipídeos citoplasmáticos existentes nas células, por exemplo, no vitelo, através de centrifugação, não comprometeu o desenvolvimento embrionário, além de ter aumentado a resistência dos embriões expostos a 4°C.

O vitelo pode ser também um dos principais fatores de impedimento da criopreservação de embriões de peixes de clima temperado, pois estas espécies apresentam maior quantidade de vitelo, o que pode dificultar ainda mais a permeação dos crioprotetores. Em estudos realizados por Beirão et al. (2006) foi observado que as técnicas tradicionais de incorporação de crioprotetores têm falhado no sentido de proteger todos os compartimentos do embrião, especialmente o vitelo. Assim, estes autores testaram microinjeções de crioprotetores aplicadas diretamente no vitelo e observaram que os embriões microinjetados com baixas concentrações de crioprotetores (DMSO, metanol, etilenoglicol e sacarose) apresentaram taxas de eclosão e sobrevivência de larvas de 75 e 90%, respectivamente. A sacarose foi o crioprotetor mais tolerado mesmo em alta concentração e volume de solução.

A característica acidofilia dos grânulos de vitelo (VITG) sofreu efeito apenas da utilização de sacarose ( $P < 0,05$ ). Porém, como pode ser observado na Tabela 4, também houve efeito significativo ( $P < 0,01$ ) da interação crioprotetor x sacarose, mostrando que a utilização ou não de sacarose alterou os resultados de acidofilia dos núcleos, de acordo com o crioprotetor utilizado. Com o uso do metanol, a acidofilia foi maior associado a sacarose e, por outro lado, com o uso do etilenoglicol, a acidofilia não diferiu associando ou não a sacarose.

De acordo com Cabrita et al. (2006) e Janik et al. (2000) o vitelo é um dos compartimentos que mais sofre danos pela permeação insuficiente dos crioprotetores. No presente estudo o vitelo, estrutura embrionária considerada uma das mais

importantes para o desenvolvimento embrionário, apresentou-se mais preservado quando exposto ao crioprotetor etilenoglicol associado a sacarose.

Tabela 4 – Análise de *deviance* para avaliar diferenças significativas entre os crioprotetores metanol e etilenoglicol, com ou sem a utilização de sacarose, para a característica acidofilia dos grânulos de vitelo.

ANODEV	GL	Deviance	$\chi^2$	Pr
Intercepto		273,31		
Sac	1	262,31	5,5**	0,02
Crio	1	262,07	0,12	0,73
Interação Crio x Sac	1	232,68	14,69***	0,00
Conc. (Crio)	2	224,07	3,96	0,14

\*GL: graus de liberdade; \*\*\*P<0,01; \*\*P<0,05; Crio: crioprotetores; Sac: sacarose; Con (Crio): concentração de crioprotetor.

Durante o processo de desenvolvimento ovocitário, as células germinativas femininas ou ovogônias, passam por profundas modificações, sendo que o processo celular pelo qual o citoplasma acumula substâncias de reserva para posterior utilização na alimentação do embrião, o vitelo, pode ser considerado um dos mais importantes (Vazzoler, 1996). À medida que os ovócitos completam seu desenvolvimento, a vitelogênese se completa e os grânulos de vitelo vão se tornando cada vez mais acidófilos, pela deposição de conteúdo protéico na forma de plaquetas acidófilas. Os ovócitos maduros, aqueles com vitelogênese completa apresentam tamanho aumentado em função do aumento do número de grânulos protéicos. Não se percebem as vesículas lipídicas e os grânulos protéicos aumentam em tamanho. Desta maneira, os grânulos de vitelo do presente estudo se apresentam moderadamente acidófilos, indicando a presença de vesículas lipídicas e protéicas, como demonstrado na Tabela 1.

Streit Jr. et al. (2007) encontraram resultados positivos na combinação do crioprotetor externo e interno. Propriedades positivas da sacarose, quando utilizada com outro crioprotetor extracelular, também foram destacadas por Woelders (1997) que consideram como ponto principal a estabilidade da membrana celular, especialmente no que se refere a deformação mecânica provocada pela saída da água durante o processo de congelamento e entrada do crioprotetor intracelular. Este fato é evidenciado por Farkas et al. (2001) que deixaram claro a necessidade da manutenção estrutural e funcional da camada fosfolipídica, quando a estrutura está sendo exposta a uma nova temperatura.

Os resultados do presente estudo com a utilização do etilenoglicol comprovaram que a acidofilia dos grânulos de vitelo não diferiu usando ou não a sacarose. Mesmo não tendo associado o crioprotetor etilenoglicol com o crioprotetor externo, a sacarose. Streit Jr. et al. (2007) observaram resultado negativo com a utilização do etilenoglicol. Estes autores verificaram a toxidez do crioprotetor etilenoglicol, reforçada pelo resultado obtido no tratamento em que se utilizou apenas água sem crioprotetor, resultando em taxa de eclosão das larvas de 6%. A não eclosão nos tratamentos com etilenoglicol, de acordo com tais autores, pode estar relacionada a interferência do etilenoglicol no metabolismo do embrião, causando desestruturação celular e, conseqüentemente, a morte.

Houve diferença significativa ( $P < 0,01$ ) entre os tratamentos com e sem o uso da sacarose também para a característica de quantidade de núcleos da camada sincicial vitelina (CSVN) (Tabela 5), sendo que a utilização da sacarose contribuiu positivamente para esta característica.

Tabela 5 – Análise de *deviance* para avaliar diferenças significativas entre os crioprotetores metanol e etilenoglicol, com ou sem a utilização de sacarose, para a característica de número de núcleos da camada sincicial vitelina.

ANODEV	GL	Deviance	$\chi^2$	Pr
Intercepto		201,56		
Sac	1	183,13	9,21***	0,00
Crio	1	180,71	1,21	0,27
Interação Crio x Sac	1	177,44	1,64	0,20
Conc. (Crio)	2	166,85	5,29	0,07

\*GL: graus de liberdade; \*\*\* $P < 0,01$ ; \*\* $P < 0,05$ ; Crio: crioprotetores; Sac: sacarose; Con (Crio): concentração de crioprotetor.

A camada sincicial vitelina, uma importante estrutura para a nutrição dos embriões de teleósteos, caracteriza-se como uma camada citoplasmática com vários núcleos sem membranas que os separe, podendo apresentar grânulos de vitelo fracionados no seu citoplasma, como foi observado neste estudo e nos estudos de Ninhaus-Silveira et al. (2007).

Em *Prochilodus lineatus*, *B. rerio* e *Fundulus heteroclitus* a nucleação dessa camada inicia-se na fase de mórula, período final do estágio de clivagem, pela liberação dos núcleos e do conteúdo citoplasmático de alguns blastômeros periféricos para dentro da camada sincicial vitelina (Kimmel et al., 1995; Ninhaus-Silveira et al., 2007). Em *B. rerio*, na fase de 1024 blastômeros, essa camada tem formato irregular e

aproximadamente 20 núcleos (Kimmel et al., 1995). Ninhaus-Silveira et al. (2007) não contabilizaram os núcleos dessa camada, porém, em microscopia eletrônica de transmissão foi observado a presença de muitos ribossomos, uma grande rede de endomembranas, inúmeras mitocôndrias e vesículas.

No presente trabalho foram considerados valores entre 15 e 29 núcleos como sendo a quantidade moderada de núcleos para embriões de *P. mesopotamicus* na fase de fechamento do blastóporo, em virtude do valor encontrado para *B. rerio*, de 20 núcleos, porém em uma fase anterior aos embriões deste trabalho.

Devido a camada sincicial vitelina apresentar-se como uma interface de conexão entre a blastoderme e o vitelo, muitos autores indicam essa camada como sendo uma barreira à penetração dos crioprotetores, como verificado por Hagedorn et al. (1998). Porém, Ninhaus-Silveira et al. (2007) analisando a camada sincicial vitelina em microscópio eletrônico verificaram que não há evidências morfológicas que poderiam atuar como barreira às substâncias crioprotetoras, estando de acordo com o proposto por Rawson et al. (2000).

Assim, existem outros elementos que poderiam atuar no impedimento a penetração dos crioprotetores. Trabalhos mais recentes têm considerado a natureza multicompartmental dos embriões de peixes (blastoderme e vitelo) podendo encontrar novas soluções para o sucesso da crioproteção de embriões (Janik et al., 2000). Harvey (1983) reportou a natureza multicompartmental dos embriões de “zebrafish”, observando que o glicerol protegeu somente a blastoderme e nenhum outro crioprotetor testado foi eficiente para preservar o embrião inteiro a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Suzuki et al. (1995) trabalhando com carpa, medaka e truta arco-íris reportaram entrada do crioprotetor DMSO no espaço perivitelino e em alguns tecidos, mas os níveis de permeação não foram suficientes para preservar os embriões.

Os resultados (Tabela 6) indicam que a utilização da sacarose e dos crioprotetores não afetaram o formato dos núcleos da camada sincicial vitelina (CSVF).

Tabela 6 – Análise de *deviance* para avaliar diferenças significativas entre os crioprotetores metanol e etilenoglicol, com ou sem a utilização de sacarose, para a característica de formato dos núcleos da camada sincicial vitelina.

ANODEV	GL	Deviance	$\chi^2$	Pr
Intercepto		317,26		
Sac	1	316,5	0,38	0,54
Crio	1	310,51	2,99	0,08
Interação Crio x Sac	1	295,74	7,39***	0,01
Conc. (Crio)	2	281,72	7,01**	0,03

\*GL: graus de liberdade; \*\*\*P<0,01; \*\*P<0,05; Crio: crioprotetores; Sac: sacarose; Con (Crio): concentração de crioprotetor.

A mudança no formato dos núcleos durante a formação da camada sincicial vitelina é evidente em *B. rerio* durante o período de embriogênese. Eles estão presentes e visíveis durante aproximadamente as primeiras metades de cada ciclo mitótico e durante a interfase, mudando suas formas sistematicamente. Podem apresentar formato cúbico durante as interfases iniciais tornam-se esféricos nas interfases tardias e, então, as células entram em mitose e seus núcleos tornam-se elipsóides, rapidamente antes de desaparecerem durante a prófase. Próximo do final da mitose e já anunciando a divisão celular, os núcleos tornam-se cúbicos novamente (Kimmel, 1995).

Neste trabalho, foi considerado categoria 2 para efeito do crioprotetor quando os núcleos se apresentavam pavimentoso, cúbico e/ou irregular, evidenciando que estes núcleos ainda se apresentavam em processo de divisão celular, de acordo com as observações feitas por Kimmel (1995) onde este autor também verificou mudanças no formato dos núcleos durante a formação da camada sincicial vitelina em *Brachydanio rerio*.

Portanto, a característica de formato do núcleo não é um parâmetro bom para avaliar o efeito de crioprotetores visto que os formatos dos núcleos desta camada podem mudar de acordo com a fase de divisão celular e diferenciação.

A utilização dos crioprotetores metanol e etilenoglicol também não afetaram o tamanho dos núcleos da camada sincicial vitelina (Tabela 7). Entretanto, o efeito significativo (P<0,05) da sacarose foi dependente do crioprotetor utilizado, devido ao efeito também significativo (P<0,05) de interação crioprotetor x sacarose. Portanto, como indicado na Tabela 1, no tratamento com o crioprotetor etilenoglicol, a utilização da sacarose contribuiu para aumentar o tamanho dos núcleos da camada sincicial vitelina, porém, com o tratamento do metanol a característica não mudou com a sacarose.

Tabela 7 – Análise de *deviance* para avaliar diferenças significativas entre os crioprotetores metanol e etilenoglicol, com ou sem a utilização de sacarose, para a característica de tamanho dos núcleos da camada sincicial vitelina.

ANODEV	GL	Deviance	$\chi^2$	Pr
Intercepto		367,69		
Sac	1	357,86	4,91**	0,03
Crio	1	355,74	1,06	0,30
Interação Crio x Sac	1	346,28	4,73**	0,03
Conc. (Crio)	2	315,75	15,27***	0,00

\*GL: graus de liberdade; \*\*\*P<0,01; \*\*P<0,05; Crio: crioprotetores; Sac: sacarose; Con (Crio): concentração de crioprotetor.

Muitos trabalhos têm sido realizados com o esforço de se encontrar a melhor combinação de crioprotetores externo e interno para permitir um bom desenvolvimento embrionário. Resultado contrário ao presente estudo foi demonstrado para *B. rerio* onde o metanol associado a sacarose 0,1M mostrou ser a melhor solução para a criopreservação de embriões de “zebrafish” (Zhang e Rawson, 1995).

Ahammad et al. (2002) incubaram embriões de carpa comum (*C. carpio*) em temperaturas de 4, 2, 0, -2, -4, -6 e -8°C, após serem tratados com diferentes concentrações de metanol, além da combinação com trealose e sacarose 0,1M e observaram ser a combinação metanol + trealose a melhor resposta para estocagem de um a 28 dias. Em 2003 estes autores observaram que a trealose 0,1M também apresentou melhores resultados em relação a sacarose associada ao metanol e propilenoglicol, para embriões de “rohu” (*Labeo rohita*).

Em trabalho para caracterizar a principal barreira de permeabilidade em embriões de “zebrafish” Hagedorn et al. (1998) observaram que não houve dano a camada sincicial vitelina após o tratamento com as soluções crioprotetoras DMSO e propilenoglicol, as estruturas celulares dessa camada estavam intactas e mostraram morfologia normal, o que foi observado também no presente estudo em relação a esta camada. Porém, Hagedorn et al. (1998) submetendo os embriões aos mesmos crioprotetores e as técnicas de congelação observaram que os embriões exibiram alterações morfológicas somente na camada sincicial vitelina, sendo que muitas organelas foram destruídas, principalmente na região do fechamento do blastóporo, alguns núcleos dessa camada estavam presentes, porém com cromatina inalterada e a membrana nuclear não estava intacta.

A diferenciação celular das camadas germinativas primárias foi afetada pelo crioprotetor (P<0,01), mas não pela sacarose (Tabela 8). De acordo com as médias

obtidas (Tabela 1) os resultados do uso do crioprotetor etilenoglicol foi o que permitiu maior diferenciação da camada germinativa primária em comparação com o metanol.

Tabela 8 – Análise de *deviance* para avaliar diferenças significativas entre os crioprotetores metanol e etilenoglicol, com ou sem a utilização de sacarose, para a característica de diferenciação celular das camadas germinativas.

ANODEV	GL	Deviance	$\chi^2$	Pr
Intercepto		311,8		
Sac	1	310,8	0,50	0,48
Crio	1	281,07	14,86***	0,00
Interação Crio x Sac	1	278,96	1,05	0,31
Conc. (Crio)	2	275,9	1,53	0,47

\*GL: graus de liberdade; \*\*\*P<0,01; \*\*P<0,05; Crio: crioprotetores; Sac: sacarose; Con (Crio): concentração de crioprotetor.

Durante o período de gastrulação o embrião inicia seus movimentos morfogênicos, conhecidos por epibolia, convergência e extensão. Todos esses movimentos definem o eixo embrionário e produzem as camadas germinativas primárias. No início, essas camadas são compostas pelas células mais externas, as células envoltentes (EVL) e as células mais profundas. Mais tarde, devido aos movimentos morfogênicos, ocorre um rearranjo dessas células e essa camada se distingue em duas estruturas importantes, o epiblasto e o hipoblasto. No final da gastrulação uma terceira camada aparece, o mesoderma. O epiblasto, hipoblasto e mesoderma serão as futuras camadas ectoderma, endoderma e mesoderma, as quais darão origem a todas as estruturas do corpo da larva (Kimmel et al., 1995).

Assim, no presente estudo, o crioprotetor etilenoglicol permitiu melhor diferenciação das camadas germinativas primárias, sugerindo que houve maior desenvolvimento dos embriões submetidos a esse crioprotetor.

Resultados negativos com etilenoglicol foram obtidos por Streit Jr. et al. (2007) observando a toxidez deste crioprotetor, não ocorrendo a eclosão nos tratamentos onde ele estava presente. Este fato sugere que a não eclosão nos tratamentos com etilenoglicol pode estar relacionada a interferência desse crioprotetor no metabolismo do embrião, provocando desestruturação celular e, conseqüentemente, morte. De acordo com Kusuda et al. (2002), trabalhando com blastômeros de “chum salmon” (*Oncorhynchus keta*) a susceptibilidade dos embriões ocorre em função da degeneração celular e das proteínas da membrana nuclear, em virtude da desidratação e aumento na concentração salina decorrentes do contato com o crioprotetor. A ação tóxica do

crioprotetor pode estar relacionada com o estágio de desenvolvimento do embrião, como demonstrou Dinnyés et al. (1998).

Resultados positivos com o crioprotetor etilenoglicol também foram encontrados por Cabrita et al. (2006) trabalhando com “gilthead seabream” (*Sparus aurata*) observando que embriões tratados com etilenoglicol apresentaram melhor tolerância durante 10 minutos de exposição, com taxa de eclosão significativamente maior em comparação a obtida pelo DMSO, metanol ou propanodiol nas mesmas concentrações.

O efeito da concentração dentro de crioprotetor foi significativo somente para as características de formato e tamanho dos núcleos da camada sincicial vitelina. Para essas características foram realizadas análises de estimação dos parâmetros da regressão multinomial logística (Tabelas 9 e 10).

Os coeficientes ou parâmetros do modelo estimados foram significativos apenas para as concentrações de etilenoglicol na característica formato do núcleo da camada sincicial vitelina (CSVF) e para as concentrações de metanol na característica tamanho dos núcleos da camada sincicial vitelina (CSVT).

Tabela 9 – Análise de estimação dos parâmetros da regressão multinomial logística para a característica de formato dos núcleos da camada sincicial vitelina (CSVF).

Parâmetro	GL	Valor Estimado	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança (95%probabilidade)		$\chi^2$	Pr > $\chi^2$
METANOL <sup>1</sup>							
Intercepto 1 ( $\beta_0$ )	1	-4,5371	1,5648	-7,6042	-1,4701	8,41***	0,0037
Intercepto 2 ( $\beta_0$ )	1	-2,3526	1,3861	-5,0692	0,3641	2,88	0,0896
Concentração ( $\beta_1$ )	1	13,8672	13,1548	-11,9158	39,6502	1,11	0,2918
ETILENOGLICOL <sup>2</sup>							
Intercepto 1 ( $\beta_0$ )	1	0,8007	1,206	-1,5631	3,1644	0,44	0,5068
Intercepto 2 ( $\beta_0$ )	1	2,1158	1,2416	-0,3178	4,5494	2,9	0,0884
Concentração ( $\beta_1$ )	1	-24,8631	12,5472	-49,4552	-0,271	3,93**	0,0475

\*GL: graus de liberdade; \*\*\*P<0,01; \*\*P<0,05

As estimativas da regressão dos efeitos de concentração ( $\beta_1$ ) foram negativas. Este fato indica que houve um efeito negativo da concentração de crioprotetor sobre a resposta média das características CSVF e CSVT. Isso pode ser visualizado pela Tabela 11 das respostas médias das características em função das doses de crioprotetor utilizadas.

Tabela 10 – Análise de estimação dos parâmetros da regressão multinomial logística para a característica de tamanho dos núcleos da camada sincicial vitelina (CSVF).

Parâmetro	GL	Valor Estimado	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança (95%probabilidade)		$\chi^2$	Pr > $\chi^2$
METANOL <sup>1</sup>							
Intercepto 1 ( $\beta_0$ )	1	3,6188	1,2841	1,1019	6,1356	7,94***	0,0048
Intercepto 2 ( $\beta_0$ )	1	6,481	1,5813	3,3817	9,5802	16,8***	<,0001
Concentração ( $\beta_1$ )	1	-44,7153	13,3044	-70,7913	-18,6392	11,3***	0,0008
ETILENO GLICOL <sup>2</sup>							
Intercepto 1 ( $\beta_0$ )	1	0,86	1,1676	-1,4284	3,1484	0,54	0,4614
Intercepto 2 ( $\beta_0$ )	1	3,1976	1,2739	0,7009	5,6944	6,3**	0,0121
Concentração ( $\beta_1$ )	1	-11,2091	11,678	-34,0976	11,6794	0,92	0,3371

\*GL: graus de liberdade; \*\*\*P<0,01; \*\*P<0,05.

Tabela 11 – Respostas médias das características de formato e tamanho dos núcleos da camada sincicial vitelina (CSVF e CSVT) submetidos a diferentes concentrações de crioprotetores metanol e etilenoglicol.

	METANOL			ETILENO GLICOL		
	0.07	0.1	0.13	0.07	0.1	0.13
CSVF	1,29 (0,47)ab	1,07 (0,27)b	1,56 (0,73)a	2,00 (0,94)a	1,23 (0,44)b	1,39 (0,51)b
CSVT	2,53 (0,62)a	2,29 (0,73)a	1,69 (0,48)b	2,37 (0,76)a	2,46 (0,52)a	2,15 (0,69)a

\*letras diferentes na mesma linha indicam diferenças entre doses do mesmo crioprotetor à P<0,05, de acordo com o teste de contraste de médias.

Tanto para a característica de tamanho dos núcleos da camada sincicial vitelina como para o formato desses núcleos a análise de estimação dos parâmetros da regressão multinomial mostra que à medida que a concentração do crioprotetor aumenta, o tamanho e formato dos núcleos apresentam valores da categoria histológica próximos a um e dois (1 e 2). Para característica de tamanho dos núcleos presente na camada sincicial vitelina a maioria deles apresentavam tamanho pequeno a médio comparado ao tamanho dos núcleos dos blastômeros e para a característica de formato dos núcleos de embriões de pacu a maioria apresentou formato pavimentoso, cúbico e/ou irregular.

A mudança no formato dos núcleos durante a formação da camada sincicial vitelina é evidente em *B. rerio* durante o período de embriogênese. Esses núcleos mudam sistematicamente seus formatos de acordo com a fase da divisão celular (Kimmel, 1995). Desta maneira, no presente estudo esses núcleos foram encontrados em formatos variados, classificando-se na categoria 2, o que representa que os núcleos, possivelmente encontravam-se em período de divisão celular (Kimmel, 1995).

A atuação tóxica de um crioprotetor sobre o desenvolvimento embrionário também pode estar relacionada as fases do desenvolvimento embrionário, como demonstraram Dinnyés et al. (1998) em estudo com embriões de carpa (*C. carpio*). No estudo com “red drum” (*Sciaenopus ocellatus*) Gwo et al. (1995) constataram que embriões no estágio de mórula apresentaram maior resistência ao resfriamento que os estádios de oito células (embriões em estádios mais recentes) e de gástrula (embriões mais tardios).

Streit Jr. (2005) avaliando o etilenoglicol e metanol em embriões de *P. mesopotamicus*, observou que à medida que se concentrou a solução com etilenoglicol, no tempo de 20 minutos, o percentual de larvas mortas diminuiu. O percentual de ovos gorados para o etilenoglicol também foi menor nas concentrações mais elevadas, sendo de 15% e 20% comparados com o metanol que foi de 5% e 10%, no tempo de 10 minutos. Porém, este autor verificou que nas concentrações 5% e 10% os crioprotetores metanol e etilenoglicol mostraram menor toxidez para os embriões de *P. mesopotamicus*. Desta maneira, além das fases do desenvolvimento embrionário, as concentrações utilizadas de crioprotetores também podem atuar de maneira tóxica ou não em relação aos embriões.

### Conclusão

Na fase de fechamento do blastóporo de *Piaractus mesopotamicus* o desempenho do etilenoglicol na concentração 7% associado a sacarose mostrou ser a melhor combinação para preservação das estruturas embrionárias, vitelo e camadas germinativas.

### Literatura Citada

- 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**, v.37, n.4, p.318-324, 1998.
- 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**, v.44, n.2, p.114-121, 2002.
- BEGOVAC, P.C.; WALLACE, R.C. Vitelline envelop proteins in the pipefish. **Journal of Morphology**, v.193, p.117-133, 1986.

- BEIRÃO, J.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, M.P. et al. Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. **Aquaculture**, v.261, p.897-903, 2006.
- CABRITA, E. et al. Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). **Cryobiology**, v.47, n.3, p.204-213, 2003.
- CABRITA, E.; ROBLES, V.; WALLACE, J.C. Preliminary studies Cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. **Aquaculture**, v.251, p.245-255, 2006.
- CASTAGNOLLI, N.; ZUIM, S.M.F. **Consolidação do conhecimento adquirido sobre o pacu, *Colossoma mitrei* – Berg, 1895**. Boletim Técnico do CEPTA, 1985. v.5, p.1-2.
- DENNISTON, R. et al. Principles of cryopreservation. In. TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. **Cryopreservation in aquatic species**. **World Aquaculture Society**. 2000, p.59-74.
- DINNYÉS, A. et al. Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants: work in progress. **Theriogenology**, v.50, n.1, p.1-13, 1998.
- FARKAS, T.; FODOR, E.; KITAJKA, K. et al. Response of fish membranes to environmental temperature. **Aquaculture Research**, v.32, p.645-655, 2001.
- GWO, J.C. et al. Change in mechanical tolerance and chilling sensitivity of red drum (*Sciaenopus ocellatus*) embryos during development. **Theriogenology**, 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**, v.34, p.335-347, 1997a.
- HAGEDORN, M.; KLEINHANS, F.W.; ARTMOV, D. et al. Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo. **Biology of Reproduction**, v.59, p. 1240-1250, 1998.
- HAMAZAKI, T. IUCHI, I.; YAMAGAMI, K. A spawning female-specific substance reactive to antichorion (egg envelope) glycoprotein antibody in the teleost, *Oryzias latipes*. **Journal Experimental Zoology**, v. 235, p. 269-279, 1985.
- HARVEY, B. Cooling of embryonic cells, isolated blastoderms, and intact embryos of the zebrafish *Brachydanio rerio* to minus -196 Celsius. **Cryobiology**, v.20, n.5, p.440-447, 1983.
- HARVEY, B.; ASHWOOD-SMITH, M.J. Cryoprotectant penetration and supercooling in the eggs of salmonid fish. **Cryobiology**, v.19, p.29-40, 1982.
- HARVEY, B.; CHAMBERLAIN, J.B. Water permeability in the developing embryo of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. **Canadian Journal of Zoology**, v.60, p.268-270, 1982.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3-22, 2000.
- IBAMA. **Estatística da pesca 2005**: Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Brasília: IBAMA, 2007. 137p.

- IWAMATSU, T.; FLUCK, R.A.; MORI, T. Mechanical dechorionization of fertilized eggs form experimental embryology in the medaka *Oryzias latipes*. **Zoological Science**, v.10, p.945-951, 1993.
- JANIK, M.; KLEINHANS, F.W.; HAGEDORN, M. Overcoming a permeability by microinjecting cryoprotectants into zebrafish embryos (*Brachidanio rerio*). **Cryobiology**, v.41, p.25-34, 2000.
- KIMMEL C.B.; BALLARD, W.W.; KIMMEL, S.R. et al. Stages embryonic developmental of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v.203, p.253-310, 1995.
- KUSUDA, S.; TERANISHI, T.; KOIDE, N. Cryopreservation of chum salmon blastomeres by the straw method. **Cryobiology**, v.45, p.60-67, 2002.
- LIMA, R.V.A. et al. **Tecido germinativo ovariano e ciclo reprodutivo de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) mantidos em cativeiro**. Boletim Técnico do CEPTA, 1991, v.4, n.1, p.1-46.
- MYERS, R.H.; MONTGOMERY, D.C.; VINING, G.G. 2002. Generalized linear models, with applications in engineering and the sciences. **John Wiley and Sons Press**, NY, USA, 342 p.
- NAGASHIMA, H.; KASHIWAZAKI, N.; ASHMAN, R. J. et al. Cryopreservation of porcine embryos. **Nature**, v.374, p.416, 1995.
- NELDER, J.A.; WEDDERBURN, R.W.M. Generalized Linear Models. **Journal of the Royal Statistical Society A**, v.35, p.370-384, 1972.
- NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A. et al. Structural and ultrastructural characteristics of the yolk syncytial layer in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Teleostei, Prochilodontidae). **Zygote**, v.15, p.267-271, 2007.
- RALL, W.F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, v.24, p.387-402, 1987.
- RAWSON, D.M; ZHANG, T.; KALICHARAM, D. et al. 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 aspect structural and functional relationships with respect to cryoprotectant penetration. **Aquatic Living Resources**, v. 31, p.325-36, 2000.
- SAS INSTITUTE. SAS/STAT<sup>®</sup>. **User's guide: statistics, versão 8.1**. 4 ed., v.2, Cary: SAS Institute, 2000.
- SCHNEIDER, V.; MAZUR, P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. **Theriogenology**, v.21, p.68-79, 1984.
- STREIT Jr., D.P. **Crioprotetores e resfriamento de embriões de pacu (*P. mesopotamicus*)**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2005. 75p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, 2005.
- STREIT Jr., D.P. et al. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.8, 2007.
- SUZUKI, T. et al. Relation between toxicity of cryoprotectant Me<sub>2</sub>SO and its concentration in several fish embryos. **Fisheries Science**, v.61, n.3 p.193-197, 1995.

- VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.357-364, 2000.
- VAZZOLER, A.E.A.M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EDUEM, 1996.
- WOELDERS, H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. **The Veterinary Quarterly**, v.19, p.135-138, 1997.
- ZHANG, T.; RAWSON, D.M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology**, v.32, p.239-246, 1995.
- ZHANG, T.; RAWSON, D.M. Studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology**, v.33, p.1-13, 1996.
- ZHANG, T.; RAWSON, D.M.; MORRIS, G.J. Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Aquatic Living Resources**, v.6, p.145-153, 1993.

## **CAPÍTULO 3**

Injúrias causadas em embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos as técnicas de congelação e descongelação após a utilização de crioprotetores intra e extracelulares

**Injúrias causadas em embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos as técnicas de congelação e descongelação após a utilização de crioprotetores intra e extracelulares**

**RESUMO:** Embriões de *Piaractus mesopotamicus* foram criopreservados após a exposição aos crioprotetores, metanol e etilenoglicol, nas concentrações, 7%, 10% e 13%, e a adição de um crioprotetor extracelular, a sacarose 0,1 M, durante exposição de 10 minutos, com o objetivo de analisar a morfologia embrionária. Foram envasados e congelados 40 embriões/tratamento e após a descongelação três embriões, em média, resultantes desse processo foram incluídos em historesina, corados com hematoxilina-eosina e analisados em microscópio óptico (MO). Um palhete/tratamento contendo embriões foi descongelado e mantido em incubadora com o objetivo de acompanhar o desenvolvimento, não resultando, entretanto na eclosão de embriões. Amostras de dois embriões submetidos aos tratamentos com metanol na concentração de 10% associado ou não a sacarose, etilenoglicol 10% associado a sacarose e os tratamentos água e água com sacarose congelados e não congelados foram processados e analisados em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Apesar dos embriões apresentarem as estruturas típicas da fase, como, córion, vitelo, camada sincicial vitelina e blastoderme, as mesmas encontravam-se alteradas em 100% dos embriões quando analisadas em MO e MEV. O córion apresentou-se irregular e rompido; ausência de individualização dos grânulos de vitelo; camada sincicial vitelina apresentou formato, espessura e tamanho irregulares e a blastoderme apresentou núcleos alterados no formato e às vezes ausentes, localizada em regiões atípicas ou ausentes em alguns embriões. Nenhum tratamento foi efetivo para preservação do embrião e conseqüente eclosão. Os protocolos utilizados não evitaram a formação de gelo intracelular resultando em injúrias celulares durante os processos de congelação e descongelação, inviabilizando os embriões de *P. mesopotamicus*.

**Palavras-chave:** etilenoglicol, injúrias celulares, metanol, microscopia eletrônica de varredura, sacarose

**Injury caused in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos submitted to the freezing and thawing techniques after the use of cryoprotectants intra and extracellulares**

**ABSTRACT:** Embryos of *Piaractus mesopotamicus* were cryopreserved after the exposure to cryoprotectors, methanol and ethylene glycol, in the concentrations of 7, 10 and 13% with the addition of a extracellular cryoprotector, the sucrose 0,1 M, during exposure of 10 minutes, with the objective of analyzing the embryonic morphology. A total of 20 embryos/treatment were fill and frozen and after thawing three embryos, on average, resultants of that process were included in historesin, stained with hematoxilín-eosin and analyzed under optical microscope (OM). A straw/treatment containing embryos was thawed and maintained in incubator in order to observed the development, not resulting, meantime in the embryos outbreak. Samples of two embryos submitted to the treatments with methanol and ethylene glycol in 10% concentration associated or not with sucrose and the treatments water and water with sucrose frozen and not frozen were processed and analyzed through scanning electron microscopic (MEV). In spite of the embryos presenting the typical structures of the phase such as chorion, yolk, yolk syncytial layer and germ layers they were altered in 100% when the embryos were analyzed under OM and MEV. The chorion became irregular and broken; absence of individualization of the yolk granules; yolk syncytial layer presented formed, thickness and irregular size and the blastoderm presented altered nuclei in the shape and sometimes lacking, located in atypical areas or absent in some embryos. No treatment was effective for embryo preservation and consequent outbreak. The used protocols did not avoid the formation of intracellular ice resulting in serious morphology alterations during the freezing processe, making unfeasible the embryos of *P. mesopotamicus*.

**Key words:** ethylene glycol, cells injury, methanol, scanning electron microscopic and sucrose

## Introdução

O aperfeiçoamento do manejo reprodutivo e aplicação de biotecnologias nos processos reprodutivos como a criopreservação e resfriamento de embriões de peixe é uma linha promissora da aqüicultura. No início da década de 90 o avanço tecnológico e a utilização biotecnologias nos processos reprodutivos se consolidaram com o domínio da tecnologia de criopreservação de sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Esta espécie apresenta além da facilidade na adaptação as condições de cultivo, hábito alimentar onívoro, crescimento rápido, fecundidade elevada, fácil adaptação à alimentação artificial e principalmente grande aceitação no mercado consumidor (Castagnolli & Zuim, 1985) sendo que sua produção foi de 10.858,00 toneladas em 2005 (IBAMA, 2007).

A criopreservação visa manter o metabolismo celular em estado quiescente, tornando possível a conservação de células e tecidos por tempo indeterminado. O sucesso na criopreservação de embriões de peixe poderia abrir novas perspectivas no cultivo e manejo de espécies ameaçadas de extinção contribuindo na preservação de espécies raras (Wildt, 1993); fornecer embriões de algumas espécies em determinadas estações do ano que não poderiam desovar naturalmente (Janik et al., 2000), com aumento na produção comercial (Ballou, 1992) e manutenção de estoque de grande diversidade de genes.

Hagedorn et al. (1997a) destacaram fatores relacionados as características dos embriões que impedem que sua criopreservação seja um sucesso: tamanho dos ovos e dos grânulos de vitelo, permeabilidade das membranas embrionárias e ovos com alta sensibilidade ao frio.

Em todas as espécies animais são utilizadas soluções crioprotetoras intracelulares e extracelulares indispensáveis para submeter os embriões a temperatura abaixo de 0° C. Estas soluções podem ter ação dentro ou fora das células embrionárias (Denniston et al., 2000).

Os crioprotetores intracelulares são solutos orgânicos com baixo peso molecular responsáveis por proteger as organelas celulares durante o resfriamento, podendo atravessar as membranas celulares com relativa facilidade. Os mais comumente utilizados são o etilenoglicol, propilenoglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, metanol e etanol. Os crioprotetores extracelulares são as macromoléculas e açúcares com alto peso molecular cuja função é reduzir a formação de gelo, facilitar a

desidratação das células e proteger a membrana celular, não podendo permear as células. Os mais utilizados são a sacarose, glicose, lactose (Denniston et al., 2000).

As características fundamentais para um eficiente agente crioprotetor é o baixo peso molecular, como é o caso dos crioprotetores intracelulares, sua alta capacidade de atravessar a membrana da célula e baixa toxicidade. Geralmente, agentes com rápida capacidade de penetração são mais favoráveis, pois diminui o tempo de exposição ao crioprotetor antes do resfriamento, prevenindo injúrias osmóticas (Kasai et al., 1996).

Diferentes estratégias estão sendo utilizadas para minimizar os danos osmóticos, através da aplicação de crioprotetores menos tóxicos, bem como a combinação de dois ou três crioprotetores (Kasai et al., 1996; Vajta, 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar morfológicamente as injúrias causadas em embriões de pacu (*P. mesopotamicus*) submetidos as técnicas de congelação e descongelação após a utilização de crioprotetores intra e extracelulares.

## **Material e Métodos**

### ***Local***

Este estudo desenvolveu-se na Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Maringá- UEM/CODAPAR e na Estação de Hidrologia e Aqüicultura da Duke Energy International- Geração Paranapanema, em Salto Grande (SP), Laboratório de Histotécnica Animal do Departamento de Ciências Morfofisiológicas da UEM e no Complexo Central de Apoio à Pesquisa da UEM –COMCAP, de novembro de 2005 até novembro de 2007.

### ***Animais e experimento***

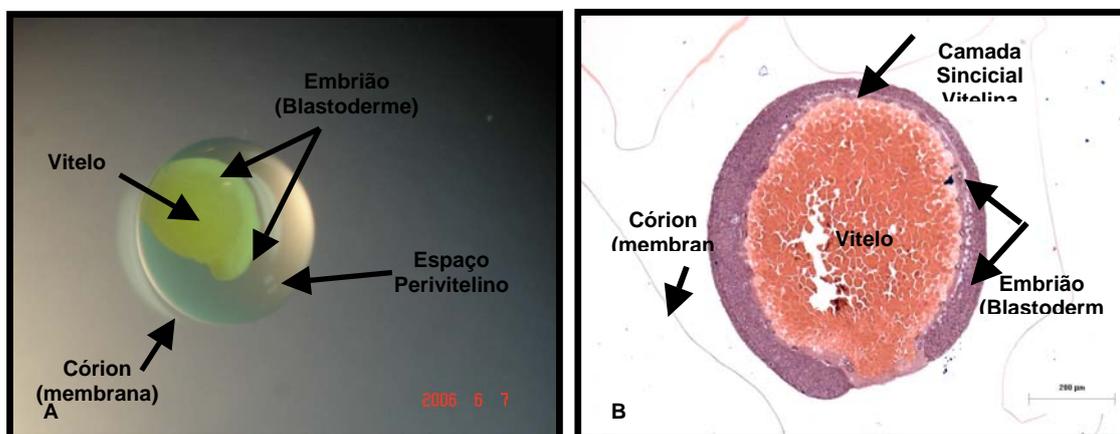
Foram utilizados 10 machos e 10 fêmeas de pacu (*P. mesopotamicus*) com idade de quatro anos selecionados do plantel de reprodutores da Duke Energy, quando apresentavam características reprodutivas secundárias de peixes migradores como abdômen abaulado e macio, orifício urogenital avermelhado e intumescido e os machos liberavam sêmen com uma leve compressão no abdômen.

Após a seleção os animais foram submetidos a indução hormonal em laboratório através de aplicações hormonais intramusculares, entre a nadadeira dorsal e a linha lateral. Ministrou-se 2,5 e 5,5 mg de extrato de hipófise de carpa/Kg de peso vivo de peixe, para machos (em uma dose) e fêmeas (duas doses, 10% na primeira e 90% na

segunda), respectivamente. Foram selecionados ovócitos de 10 fêmeas de pacu os quais foram fertilizados com “pool” de sêmen.

Após a fertilização, os ovos foram incubados em incubadoras do tipo vertical, ligadas a um sistema fechado de água com temperatura controlada de 27,7°C. A desova foi obtida através do sistema seminatural.

Quando 80% dos ovos apresentavam-se em estágio de fechamento do blastóporo com 90% de epibolia (aproximadamente 9 horas de incubação) (Figura 1), observados em estereomicroscópio, colheu-se uma alíquota de aproximadamente 1500 ovos viáveis da incubadora, sendo descartados os ovos esbranquiçados (gorados). Após a drenagem do excesso de água com uma peneira, os ovos foram mergulhados nas soluções crioprotetoras, previamente preparadas. Para cada tratamento foram utilizadas amostras de 40 embriões em média, com córion.



Figuras 1 - Indicação dos componentes embrionários e extra-embrionários de pacu (*P. mesopotamicus*). A- Imagem obtida a partir de estereomicroscópio. B- Fotomicrografia do embrião em estágio de fechamento do blastóporo H.E (10x).

### ***Soluções crioprotetoras***

As soluções crioprotetoras testadas foram o metanol e etilenoglicol em três concentrações (7, 10 e 13%) e a adição de um crioprotetor extracelular, a sacarose 0,1M (Zhang & Rawson, 1995). Todos os embriões foram expostos as soluções crioprotetoras durante 10 minutos

Para as soluções crioprotetoras, metanol e etilenoglicol, nas três concentrações, preparou-se previamente uma diluição para 50 mL em béquer, devidamente identificados, em uma temperatura média de  $27,5 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ . Assim, foram repetidos para todos os tratamentos e também para o tratamento controle que continha apenas água destilada e para o tratamento que continha água e sacarose (Figura 2).

### ***Criopreservação dos embriões***

Após terem sido submetidos aos tratamentos, os embriões foram submetidos as técnicas de congelação em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) para verificar as injúrias celulares causadas aos embriões criopreservados.

Cada tratamento consistiu de uma amostra de 40 embriões, onde foram envasados em palhetes de 0,5 mL e submetidos ao aparelho de congelação de embriões, *Biocool* (BIO-COOL III FITSSYSTE MS, INC). No *Biocool* os embriões foram submetidos a uma curva de congelação de 1°C /min até -33°C. Em seguida foram colocados diretamente nas canecas do botijão de estocagem com capacidade de 34 litros.

Após o período de estocagem de 40 dias os embriões foram retirados dos botijões de nitrogênio e submetidos aos protocolos de descongelação.

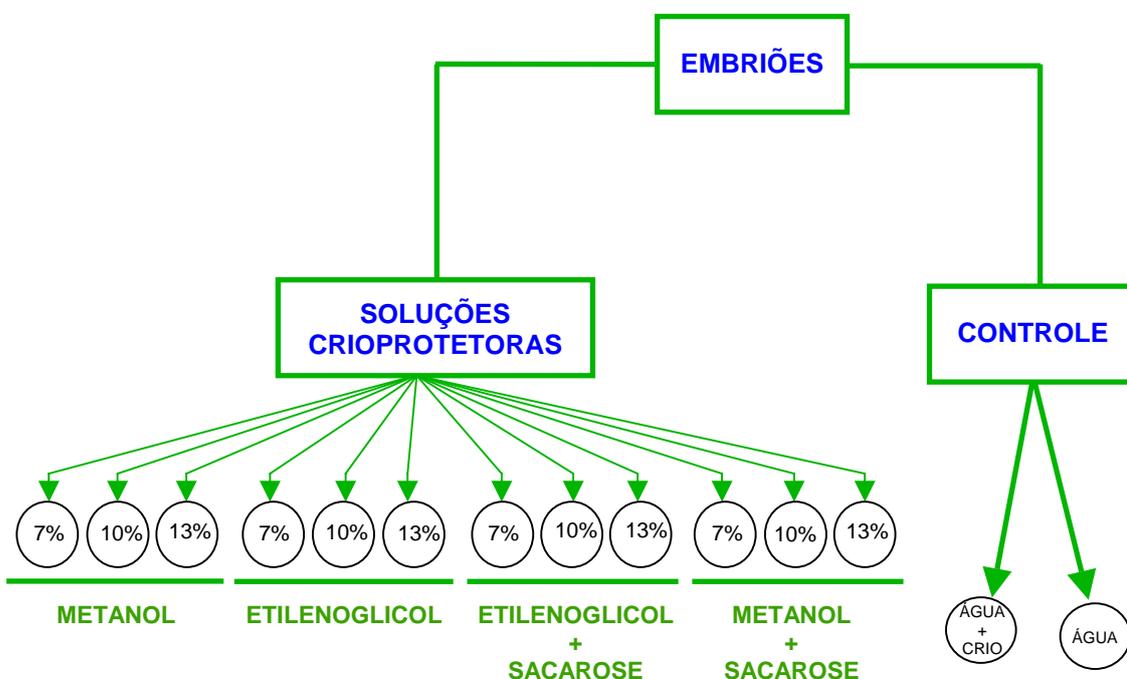


Figura 2. Esquema dos tratamentos que os embriões de pacu (*P. mesopotamicus*), em estágio de fechamento do blastóporo foram submetidos, durante 10 minutos, em soluções crioprotetoras intracelulares, metanol e etilenoglicol em diferentes concentrações, e o crioprotetor extracelular sacarose 0,1M.

### ***Descongelação dos embriões***

Os palhetes foram descongelados imediatamente um a um, a temperatura de 45°C por 10 segundos em banho-maria.

Após a descongelação, os embriões foram expostos a um processo para a retirada dos crioprotetores e conseqüente hidratação (Figura 3). Os embriões expostos aos crioprotetores metanol e etilenoglicol nas concentrações 7% foram submetidos às

concentrações decrescentes dos mesmos crioprotetores (6, 4, 2, 1% de crioprotetores) até H<sub>2</sub>O destilada durante 30 segundos em cada uma delas. O mesmo esquema foi seguido para as concentrações de 10 e 13% de crioprotetores.

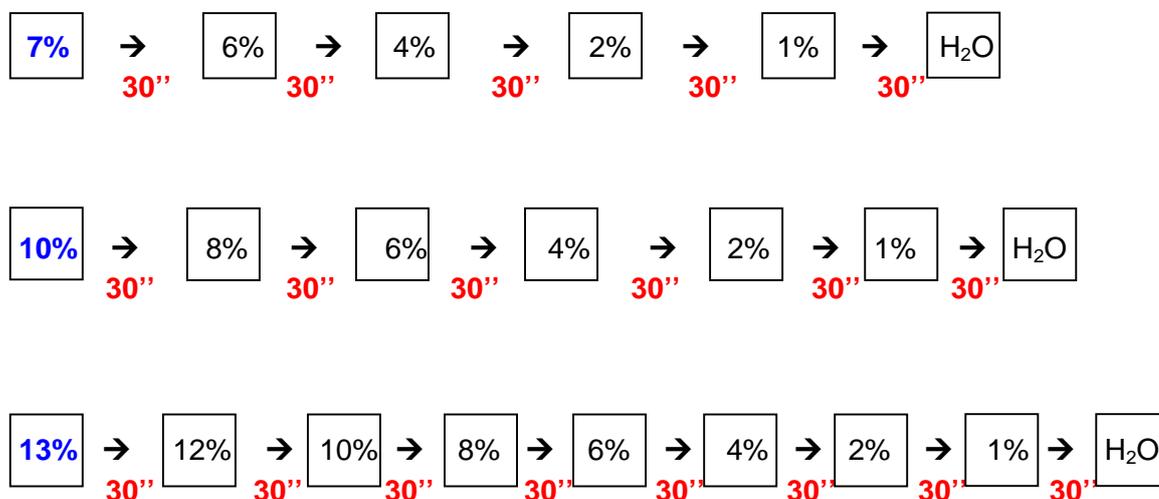


Figura 3. Esquema para a retirada dos crioprotetores e consequente hidratação dos embriões de pacu (*P. mesopotamicus*), em estágio de fechamento do blastóporo, submetidos a diferentes agentes crioprotetores, metanol e etilenoglicol, em três concentrações diferentes, durante 10 minutos.

Um palhete de cada tratamento foi descongelado, consequentemente hidratado pelo mesmo esquema acima e os embriões colocados para eclodir em incubadoras a temperatura de 27°C durante 15 horas.

Os embriões que foram submetidos aos tratamentos com água e água + sacarose não suportaram o processo de hidratação e à medida que passavam pelas soluções crioprotetoras para hidratação, eles se desfaziam, não restando embrião para incubar.

### ***Avaliação morfológica dos embriões***

#### ***Estudo ao Microscópio Óptico***

Após terem sido submetidos aos protocolos de hidratação (Figura 3) os embriões foram imediatamente colocados em solução de “Bouin” e em seguida estes foram incluídos em resina 2-hidroxietilmetacrilato (*Leica Historessin*) sendo processados 3 embriões/tratamento, seccionados de forma seriada com 3µm de espessura (seis cortes/embrião) corados pelo método de hematoxilina-eosina.

A análise da morfologia embrionária foi realizada no Laboratório de Histotécnica Animal do Departamento de Ciências Morfofisiológicas-UEM, com auxílio de um

microscópio óptico Olympus CBA e as imagens fotografadas através de uma câmara de alta resolução Olympus Q-COLOR 3, acoplada ao microscópio Olympus Bx41.

### ***Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)***

Foram processados dois embriões dos seguintes tratamentos: T1: água; T2: água + sacarose; T3: metanol 10% + sacarose; T4: metanol 10% e T5: etilenoglicol 10% + sacarose não submetidos as técnicas de congelamento e submetidos a congelamento e posterior descongelamento.

As amostras de cada tratamento foram fixadas em solução de Glutaraldeído 2,5%, utilizando-se o tampão cacodilato 0,1M em pH 7,2, permanecendo em geladeira até o momento da desidratação.

A desidratação ocorreu em série crescente de álcool, passando por concentrações de 30, 50, 70, 80, 90, 95% durante 30 minutos cada etapa e dois banhos em álcool 100% por 30 minutos em cada concentração.

A secagem foi em 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 foram metalizadas com íons ouro-paládio em Metalizador Desk II Denton Vacuum.

O material foi examinado e eletromicrografado em microscópio eletrônico de varredura JEOL (JSM-5410) no Complexo Central de Apoio a Pesquisa (CONCAP - UEM).

### ***Análise dos dados***

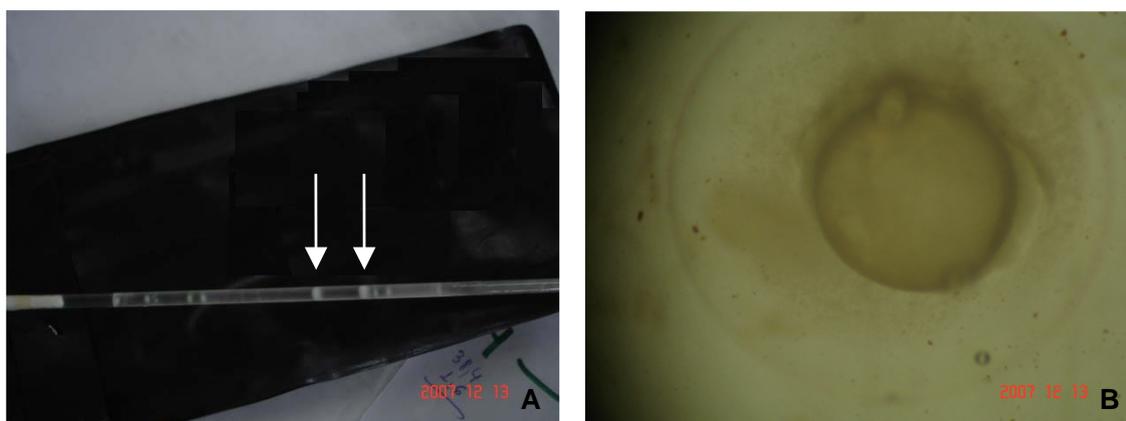
Para avaliação das características morfológicas dos embriões foi utilizado Delineamento Experimental inteiramente casualizado, em um fatorial de 2x2x3, sendo dois crioprotetores internos, metanol e etilenoglicol, com inclusão ou não do crioprotetor externo, a sacarose 0,1M e três concentrações de 7, 10 e 13% dos crioprotetores internos.

## **Resultados e Discussão**

Durante o processo de descongelamento e hidratação, os embriões de *P. mesopotamicus* apresentavam características de estarem em processo de degradação, resultando em menor número de embriões passíveis de serem processados em

historesina o que foi também observado por Robles et al. (2003) e Ninhaus-Silveira (2006) para embriões de “turbot” (*Scophthalmus maximus*) e curimatá (*Prochilodus lineatus*).

Os embriões que foram submetidos a este processo e que foram colocados em incubadoras para eclodirem apresentavam ainda dentro dos palhetes uma coloração esbranquiçada na região do vitelo, indicando a formação de cristais de gelo (Figura 4A) e mesmo após 15 horas de incubação não foi observado em nenhum dos tratamentos embriões eclodidos, e aqueles que ainda se encontravam nas incubadoras estavam gorados (Figura 4B).



Figuras 4 - Embriões de pacu (*P. mesopotamicus*). A- Indicação dos embriões dentro do palhete com coloração esbranquiçada. B- Embrião gorado após descongelação e hidratação colocado em incubadora (estereomicroscópio).

Apesar de todos os embriões de *P. mesopotamicus* congelados e descongelados resultantes apresentarem estruturas embrionárias e extra-embrionárias típicas da fase de desenvolvimento estudada, como córion, blastoderme, vitelo e camada sincicial vitelina, as mesmas estavam alteradas morfológicamente em 100% dos embriões.

O córion apresentou-se irregular, rompido, não sendo encontrado íntegro em nenhum dos embriões (Figuras 5A e 5B). Esta membrana tem sido identificada como uma das principais barreiras de permeação dos crioprotetores (Hagedorn et al., 1998). A retirada do córion com o uso da enzima pronase foi realizada por Ninhaus-Silveira et al. (2007) em curimatá e verificaram que, como em “zebrafish”, os embriões não necessitam do córion para completar seu desenvolvimento, tendo este a função de proteção contra choques mecânicos. Consideraram desnecessária sua presença em embriões criopreservados, visto que poderia atuar como uma barreira à entrada dos crioprotetores.

O vitelo apresentou-se como uma massa celular e como os grânulos não se apresentavam de maneira individualizada seu conteúdo extravasou-se, havendo partes de vitelo em vários locais do embrião, não sendo possível definir um local padrão para ser observada esta estrutura (Figuras 5A e 5D). Consideramos que a lesão das membranas celulares dos grânulos de vitelo possa ter ocorrido por vários fatores, como exposição dos embriões a baixa temperatura, pela penetração insuficiente dos crioprotetores, pelo tempo insuficiente de permeação ou pela toxidez da solução crioprotetora utilizada.

Os resultados encontrados no presente estudo são divergentes dos encontrados por Hagedorn et al. (1998) para embriões de “zebrafish”, ao observarem que o vitelo manteve-se íntegro morfológicamente, com membranas intactas e conteúdo aparentemente normal após exposição às soluções crioprotetoras, DMSO e propilenoglicol. Estes autores ressaltaram que dano causado pela baixa temperatura dentro do vitelo pode ser tolerado.

Hagedorn et al. (1998) identificaram a existência e a localização da barreira de permeabilidade para DMSO e do propilenoglicol, quantificando parâmetros de permeabilidade da água e do soluto para o vitelo e a blastoderme, através da mudança volumétrica da entrada do crioprotetor pelo 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 suficiente dentro do vitelo, ocorre a formação de cristais de gelo, danificando o embrião.

A camada sincicial vitelina apresentou-se com formato e tamanho irregulares e espessura variada. Apresentava localização atípica, sendo muitas vezes encontrada abaixo do vitelo, ou envolvendo pedaços deste separados, diferindo de embriões preservados, onde está subjacente a blastoderme, recobrando o vitelo (Figura 5B e 5C).

Hagedorn et al. (1998) observou que em embriões congelados houve alteração morfológica da camada sincicial vitelina, e que após a descongelação muitas organelas e a membrana celular foram destruídas, conservando apenas alguns núcleos com cromatina condensada ou inativa e a membrana nuclear não se apresentava totalmente intacta.

Ninhaus-Silveira (2007) observando a camada sincicial vitelina de curimatá (*P. lineatus*) verificou modificações ultraestruturais em embriões congelados quando comparados aos embriões não congelados. A camada sincicial do vitelo nos embriões

criopreservados pelo protocolo de vitrificação apresentou-se com citoplasma mais elétron-denso, com aspecto compactado, retículos colapsados, núcleos com cromatina desorganizada e rompimentos da membrana plasmática na região de contato desta camada com a endoderme, ocasionando a desestruturação das microvilosidades. Os embriões submetidos ao processo de congelação em vapor de nitrogênio líquido apresentaram citoplasma desestruturado, rede de endomembranas destruída, núcleos com a cromatina alterada, porém, com mitocôndrias preservadas.

A blastoderme apresentou núcleos alterados no formato e às vezes ausentes, com formato irregular, localizada em regiões atípicas e em alguns embriões ela estava ausente ou em pequenas porções com citoplasma sem núcleo (Figuras 5B e 5D).

Hagedorn et al. (1998) analisando exemplares de “zebrafish” após os processos de congelação e descongelação, verificaram que a estrutura da blastoderme tinha sido destruída, sugerindo que essas alterações ocorreram devido a entrada insuficiente de crioprotetor nas células.

A sobrevivência de embriões congelados ainda não foi conseguida para nenhuma espécie de peixe, pois segundo Zhang & Rawson (1995), Hagedorn et al. (1997a), Harvey (1983) e Robles et al. (2003) são muitas as variáveis a serem consideradas, como: a maioria dos ovos das espécies são grandes, semipermeabilidade das membranas ao redor do embrião e, principalmente, por apresentarem alta sensibilidade ao frio.

Zhang & Rawson (1996) relataram que a formação de cristais de gelo dentro do embrião, durante o processo de descongelação é indicada pelo branqueamento deste. Zhang et al. (1993) sugeriram que a utilização de métodos de congelação convencionais, realizados com a exposição a vapores de nitrogênio líquido, utilizados para embriões de peixes, produz inevitavelmente a formação de cristais de gelo intraembriônicos.

Ninhaus-Silveira et al. (2007) trabalhando com embriões de curimatá (*P. lineatus*) observaram em todos os tratamentos opacidade do vitelo do embrião por alguns momentos durante o processo de hidratação, caracterizando segundo Zhang et al. (1993) e Zhang & Rawson (1996) a formação de cristais de gelo intraembriônicos. O mesmo foi observado no presente estudo, podendo considerar este fator como um indicativo de que não houve penetração do crioprotetor ou que a concentração e tempos de exposição não foram suficientes para proteger o embrião contra os efeitos negativos do processo de congelação e descongelação.

Hagedorn et al. (2002) sugeriram que a hidratação contínua dos embriões descongelados, até a ruptura de suas membranas, pode estar relacionada as características estruturais de suas membranas plasmáticas. Estes autores estudando *B. rerio* verificaram que, esta espécie não possui em suas membranas proteínas transmembrânicas do tipo aquaporinas (AQPs) as quais atuam no transporte de água e íons em mamíferos. Após inserirem um tipo de aquaporina (AQP3) no DNA de exemplares de *B. rerio*, verificaram que o fluxo de propilenoglicol aumentou nos embriões modificados com esses canais de membranas.

Streit Jr. et al. (2007) encontraram resultados positivos na combinação de 9% de metanol e 17,1% de sacarose em um protocolo de resfriamento com embriões de *P. mesopotamicus*, expostos por no mínimo seis horas a -8°C. Estes embriões apresentaram menor sensibilidade ao frio quando foram submetidos a solução crioprotetora, apresentando 69,2% de taxas de eclosão em comparação ao tratamento controle que foi de 80,0%, onde os embriões foram incubados diretamente na água.

Nos trabalhos de Streit Jr. et al. (2007) os melhores resultados encontrados foram utilizando o crioprotetor intracelular metanol, com taxa de eclosão superior àquela em que o crioprotetor intracelular foi o etilenoglicol, especialmente quando sacarose foi acrescentada a solução crioprotetora, verificando que a associação do metanol a sacarose parece ser muito promissora para o sucesso de resfriamento de embriões de pacu.

A criopreservação de embriões pode ser extremamente prejudicial a organização celular dos mesmos. Dobrinsky (1996) citou em seus trabalhos que a formação de cristais de gelo intracelular pode lesar a membrana plasmática da célula e que o armazenamento em nitrogênio líquido pode desnaturar as funções intracelulares e as organelas. Em relação a citoarquitetura dos embriões, este autor verificou que pode ocorrer destruição das estruturas que participam do citoesqueleto, o que leva a perda da sua forma intracelular causando uma destruição irreparável a célula.

A prevenção da formação de cristais de gelo nas células ou tecidos é necessária para o sucesso na criopreservação e sobrevivência dos embriões. A comparação da sobrevivência dos embriões após resfriamento e porcentagem de embriões na qual houve a formação de gelo intracelular durante o resfriamento mostrou que os padrões destas curvas são similares, indicando que a formação de gelo foi, provavelmente, o principal fator de limitação da sobrevivência dos embriões (Harvey, 1983).

Quando a formação de gelo intracelular ocorre, geralmente, ela é letal (Mazur, 1984). Hagedorn et al. (2004) observaram que na ausência dos crioprotetores, a formação de gelo intracelular ocorre, aproximadamente, a  $-10^{\circ}\text{C}$ . No entanto, com a adição dos crioprotetores, a temperatura intra-embriônica de formação do gelo é de  $-20$  a  $-30^{\circ}\text{C}$ . Estes autores utilizando embriões modificados com AQP3, que são canais iônicos inseridos nas membranas dos embriões para facilitar a troca da água e dos crioprotetores, concluíram que a formação de gelo foi letal ao embrião.

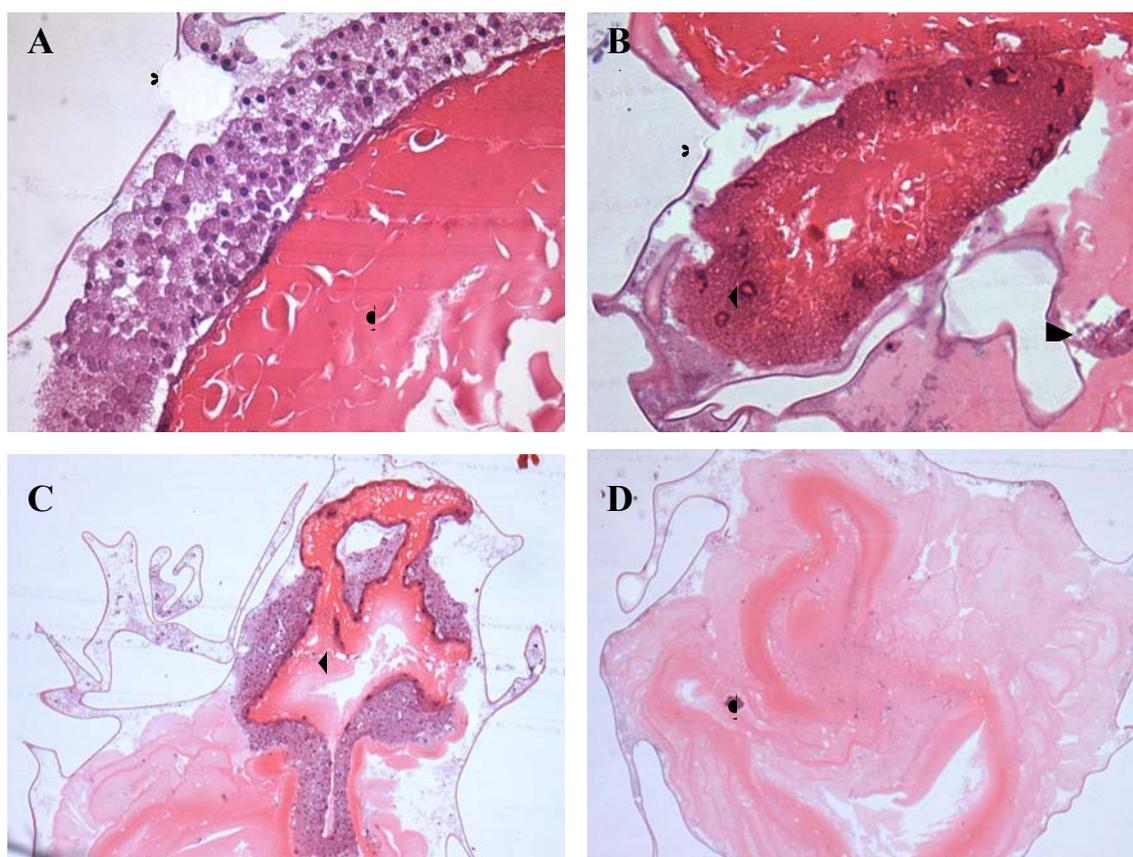


Figura 5 – Embriões de *Piaractus mesopotamicus* criopreservados. A- vitelo com aparência de massa celular (♣), córion rompido (\*) (40x). B- CSV envolvendo pedaço de vitelo (♦), pequena porção de blastoderme (▶) (20x). C- CSV com espessura variada (♦) (10x). D- blastoderme ausente, vitelo com aparência de massa celular (♣) (20x). H-E

Para melhor caracterização dos embriões submetidos as técnicas de congelação e descongelação, foram utilizadas as imagens feitas através de microscopia eletrônica de varredura. A maioria dos trabalhos de observação embrionária, tanto de desenvolvimento como de caracterização embrionária utilizam somente a avaliação sob estereomicroscópio e alguns com microscopia de luz, devido ao alto custo das análises de microscopia eletrônica. Galman & Avtalion (1989) estudando embriões de

*Oreochromis niloticus* e Shardo (1995) em *Alosa sapidissima* realizaram o estudo em microscopia eletrônica de varredura, com a finalidade de visualizar detalhes nos embriões destas espécies.

Em *P. mesopotamicus* diversos trabalhos foram realizados com a tecnologia de criopreservação e utilização de crioprotetores, porém são poucos os trabalhos com eletromicrografia de varredura para embriões desta espécie.

De acordo com Hagedorn et al. (1997a; 1997b) e Streit Jr. et al. (2005) em experimentos realizados com diferentes concentrações de crioprotetores, estes autores observaram que resultados positivos foram encontrados para embriões criopreservados submetidos a concentração de 10% de metanol com a interação do crioprotetor externo, a sacarose. Desta forma, para a realização das análises de microscopia eletrônica de varredura foram escolhidos esses tratamentos, e por ter havido perdas de embriões em virtude do processo de congelação.

A Figura 6 (A, B, C e D) foi obtida através de eletromicrografia de varredura de embrião de *P. mesopotamicus*, submetidos a crioprotetores intra e extracelulares na fase de fechamento do blastóporo e a Figura 7 (A, B, C e D) foi obtida através de eletromicrografia de varredura de embrião de *P. mesopotamicus*, submetidos às técnicas de congelação e descongelação, após serem submetidos aos mesmos tratamentos dos embriões não congelados.

Modificações ultraestruturais foram observadas quando comparados os embriões submetidos as técnicas de congelação e descongelação em relação àqueles não congelados. Os embriões submetidos as técnicas de congelação e descongelação apresentavam-se com córion rompido na maioria deles, Figuras 7A, B, C e D, ocasionado possivelmente ao processo de descongelação, já que alguns embriões no início do processo de hidratação começaram a se desfazer, permanecendo apenas pequenos pedaços do córion. O vitelo apresenta-se extravasado dos grânulos em muitos embriões, Figuras 7A e 7C, sendo que a não preservação do vitelo poder estar relacionada a permeação insuficiente dos crioprotetores em embriões submetidos a baixas temperaturas, o que leva a formação de cristais de gelo e conseqüente ruptura deste.

A formação dos cristais de gelo pode ser observada antes mesmo dos embriões entrarem em processo de hidratação, pois ainda dentro do palhetes os embriões apresentavam coloração esbranquiçada.

Na Figura 7C o embrião apresenta-se totalmente destruído, com pedaços de córion e grânulos de vitelo espalhados, ficando difícil identificar quais estruturas foram preservadas.

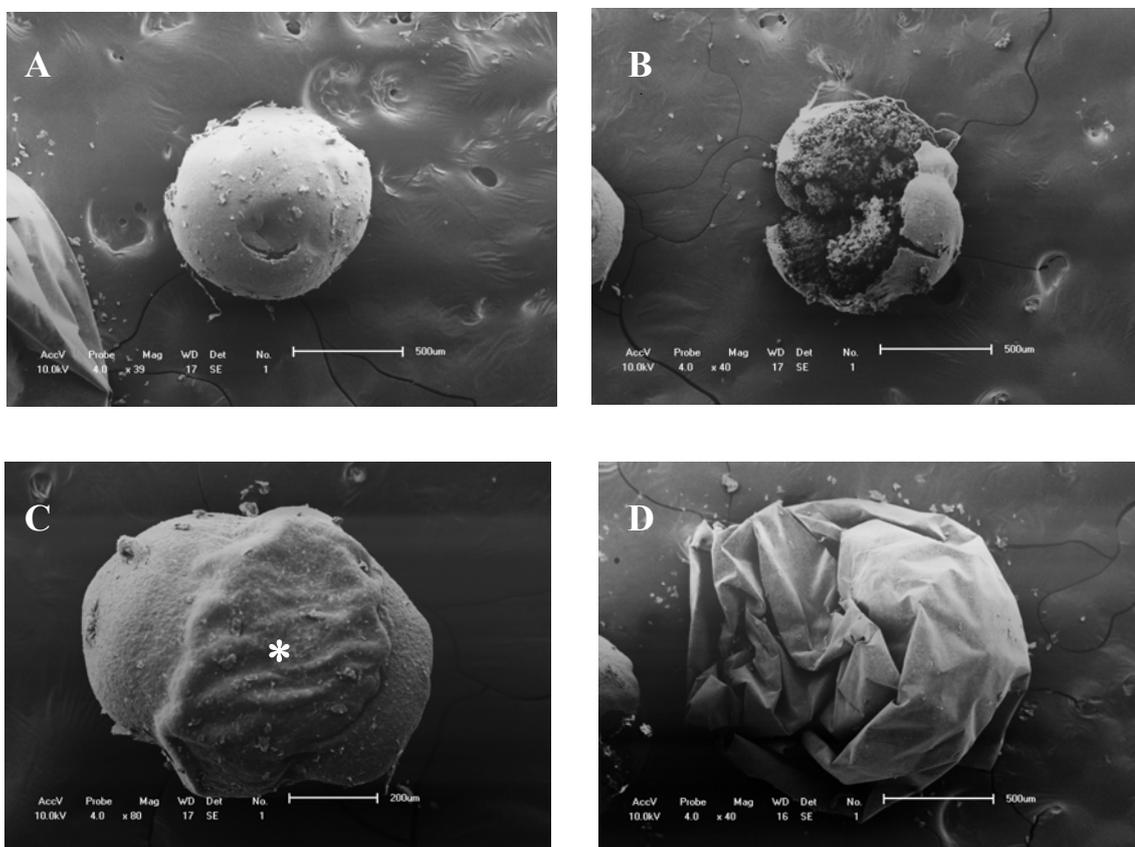


Figura 6 - Eletromicrografia de varredura de embriões de *P. mesopotamicus*, não criopreservados. A- evidenciando vitelo sem rompimento, com pequena perfuração devido a manipulação (39x). B- vitelo rompido mecanicamente, evidenciando grânulos de vitelo (80x). C- (\*) evidenciando embrião envolvendo o vitelo (40x). D- embrião envolvido pelo córion (80x).

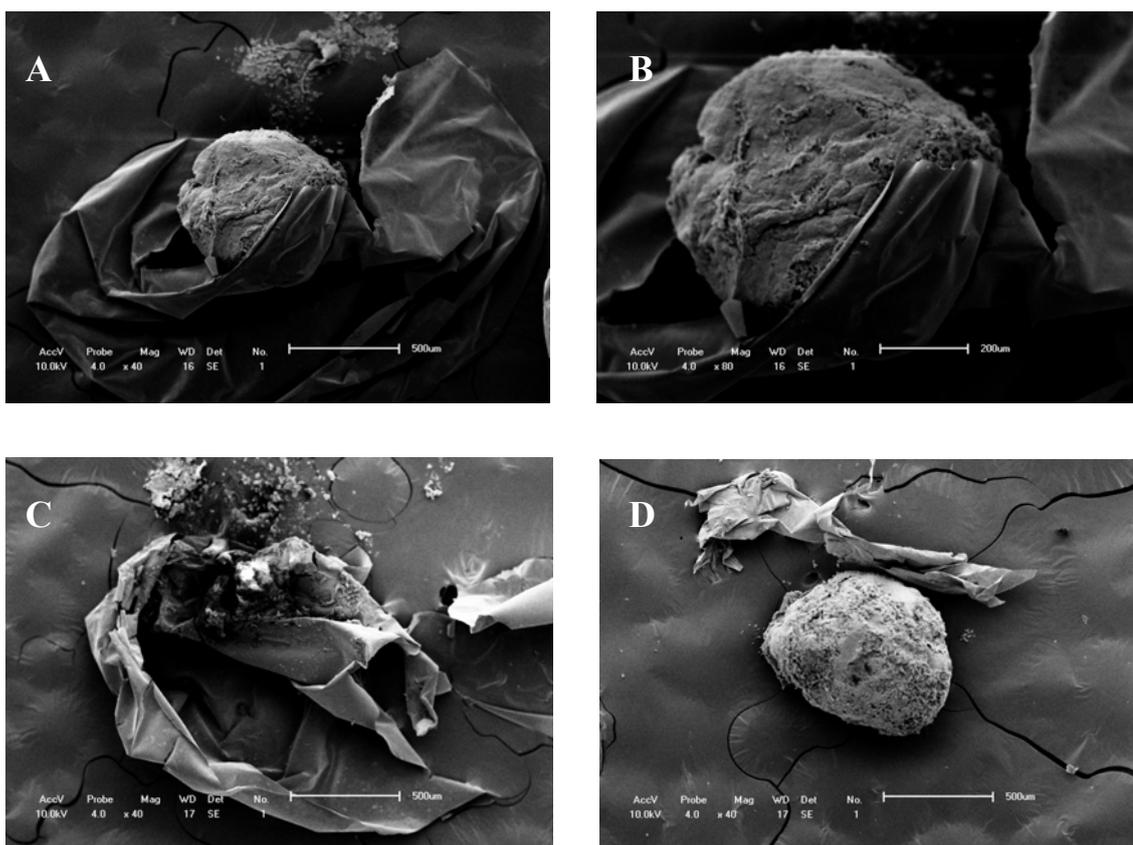


Figura 7 - Eletromicrografia de varredura de embriões de *P. mesopotamicus* criopreservados. A- vitelo envolvido pelo córion rompido, presença de grânulos de vitelo extravasado (40x). B- vitelo envolvido pelo córion, que está rompido (80x). C- evidenciando embrião destruído (40x). D- córion destruído (40x).

### Conclusão

Os protocolos utilizados no presente estudo não evitaram a formação de gelo intracelular que resultaram em alterações morfológicas graves durante os processos de congelação e descongelação, inviabilizando os embriões de *P. mesopotamicus*.

### Literatura Citada

- BALLOU, J.D. Potential contribution of cryopreserved germ plasm to the preservation of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity. *Cryobiology*, v.29, p.19–25, 1992.
- CASTAGNOLLI, N.; ZUIM, S.M.F. **Consolidação do conhecimento adquirido sobre o pacu, *Colossoma mitrei* – Berg, 1895.** Boletim Técnico do CEPTA, 1985, v.5, p.1–2.

- DENNISTON, R. et al. Principles of cryopreservation. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. **Cryopreservation in aquatic species**. World Aquaculture Society. 2000, p.59-74.
- DOBRINSKY, J.R. Cellular approach to cryopreservation of embryos. **Theriogenology**, v.45, p.17-26, 1996.
- GALMAN, O.R.; AVTALION, R.R. Further study of the embryonic development of *Oreochromis niloticus* (Ciclidae, Teleostei) using scanning electron microscopy. **Journal of Fish Biology**, v.34, p.653-664, 1989.
- HAGEDORN, M.; HSU, E.; KLEINHANS, F.W. et al. New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation. **Cryobiology**, v.34, p.335-347, 1997a.
- HAGEDORN, M.; KLEINHANS, F.W.; WEIDT, D.E. et al. Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. **Cryobiology**, v.34, n.3, p.251-263, 1997b.
- HAGEDORN, M.; KLEINHANS, F.W.; ARTMOV, D. et al. Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo. **Biology of Reproduction**, v.59, p.1240-1250, 1998.
- HAGEDORN, M.; KLEINHANS, F.W. Problems and prospects in cryopreservation of fish embryos. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. World Aquaculture Society, 2000, p.179-187.
- HAGEDORN, M. et al. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option. **Cryobiology**, v.49, n.2, p.181-189, 2004.
- HARVEY, B. Cooling of embryonic cells, isolated blastoderms, and intact embryos of the zebrafish *Brachydanio rerio* to minus -196 Celsius. **Cryobiology**, v.20, n.5, p.440-447, 1983.
- IBAMA. **Estatística da pesca 2005**: Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Brasília: IBAMA, 2007. 137p.
- JANIK, M.; KLEINHANS, F.W.; HAGEDORN, M. Overcoming a permeability by microinjecting cryoprotectants into zebrafish embryos (*Brachidanio rerio*) **Cryobiology**, 41, p.25-34, 2000.
- KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.67-75, 1996.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: Mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**, v.247, p.125-142, 1984.
- NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A. et al. Structural and ultrastructural characteristics of the yolk syncytial layer in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Teleostei, Prochilodontidae). **Zygote**, v.15, p.267-271, 2007.
- NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote**, v.14, p.217-229, 2006.
- ROBLES, V.; CABRITA, E.; REAL, M. et al. Vitrification of turbot embryos: preliminary assays. **Cryobiology**, v.47, p.30-39, 2003.

- SHARDO, J.D. Comparative embryology of teleostean fishes. I. Development and staging of the American Shad, *Alosa Sapidissima* (Wilson, 1811). **Journal of Morphology**, v.225, p.125-167, 1995.
- STREIT Jr, D.P. et al. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.8, p.1199-1202, 2007.
- STREIT Jr. et al. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. **Arquivos de Medicina Veterinária e Zoologia da UNIPAR**, v.7, n.2, p.157-162, 2005.
- VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.357-364, 2000.
- WILDT, D.E.; SEAL, U.S.; RALL, W.F. Genetic resource banks and reproductive technology for wildlife conservation. In: **Genetic Conservation of Salmonid Fishes. (J. G. Cloud and G. H. Thorgaard, Eds.)**, 1993, p.159–173.
- ZHANG, T.; RAWSON, D.M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology**, v.32, p.239-246, 1995.
- ZHANG, T.; RAWSON, D.M. Studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology**, v.33, p.1-13, 1996.
- ZHANG, T.; RAWSON, D.M.; MORRIS, G.J. Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Aquatic Living Resources**, v.6, p.145-153, 1993.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na fase de fechamento do blastóporo de *Piaractus mesopotamicus*, o desempenho do etilenoglicol na concentração 7% associado à sacarose mostrou-se a melhor combinação para preservação das estruturas embrionárias, como o vitelo e camadas germinativas.

Os protocolos utilizados no presente estudo não evitaram a formação de gelo intracelular que resultaram em alterações morfológicas graves durante os processos de congelação e descongelação, inviabilizando os embriões de *Piaractus mesopotamicus*.

Mais pesquisas deverão ser feitas com a utilização de novos crioprotetores e outras interações de crioprotetores intra e extracelulares, os quais possam ser mais eficazes na permeação em embriões de peixe, permitindo uma distribuição uniforme em todos os compartimentos embrionário, menor toxicidade e, além disso, outros métodos que poderiam facilitar a permeabilização dessas soluções para dentro dos embriões.