

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

INFLUÊNCIA DA BAIXA TEMPERATURA E DIFERENTES  
CRIOPROTETORES EM OÓCITOS E EMBRIÕES DE  
*Colossoma macropomum* e *Piaractus brachypomus*

Autora: Melanie Digmayer  
Orientador: Dr. Ricardo Pereira Ribeiro  
Coorientador: Dr. Danilo Pedro Streit Junior

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
outubro – 2013

INFLUÊNCIA DA BAIXA TEMPERATURA E DIFERENTES  
CRIOPROTETORES EM OÓCITOS E EMBRIÕES DE  
*Colossoma macropomum* e *Piaractus brachypomus*

Autora: Melanie Digmayer  
Orientador: Dr. Ricardo Pereira Ribeiro  
Coorientador: Dr. Danilo Pedro Streit Junior

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

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
outubro – 2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

D574i Digmayer, Melanie  
Influência da baixa temperatura e diferentes crioprotetores em oócitos e embriões de *Colossoma macropomum* e *Piaractus brachypomus* / Melanie Digmayer. -- Maringá, 2013.  
48 f. : il. color., figs. tabs.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro.  
Coorientador: Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Junior.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2013.

1. Congelação de embriões. 2. Injúrias embrionárias. 3. Pirapitinga. 4. Tambaqui. I. Ribeiro, Ricardo Pereira, orient. II. Streit Junior, Danilo Pedro, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

CDD 22.ed. 639.311

MGC-000833



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**INFLUÊNCIA DA BAIXA TEMPERATURA E  
DIFERENTES CRIOPROTETORES EM  
OÓCITOS E EMBRIÕES DE *Colossoma  
macropomum* E *Piaractus brachypomus***

Autora: Melanie Digmayer  
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

TITULAÇÃO: Doutora em Zootecnia - Área de Concentração Produção  
Animal

APROVADA em 01 de outubro de 2013.

Prof. Dr. Luiz Paulo Rigolon

Prof. Dr. Lauro Daniel  
Vargas Mendez

Prof. Dr. Nelson Maurício  
Lopera Barrero

Dr. Luiz Alexandre Filho

Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro  
(Orientador)

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar,  
divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa  
ou uma concha mais bonita que as outras,  
enquanto o imenso oceano da verdade  
continua misterioso diante de meus olhos”.*

Isaac Newton

*Aos*

*meus avós José Alberto (in memoriam), Zoraide, Osvaldo (in memoriam) e Grete (in memoriam), pelo porto seguro, confiança, amor e exemplo de vida*

*Aos*

*meus pais, Robert e Doralice,  
pela vida, amor, dedicação, incentivo e apoio*

*À*

*minha irmã Graziela e meus sobrinhos Davi  
e Leonardo, pela confiança, amor e  
momentos de alegria*

*Dedico*

*'Sem vocês a vida não teria sentido! Amo muito a todos.'*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, amparo, e por todas pessoas abençoadas em meu caminho.

Aos meus Pais, **Robert Digmayer e Doralice Matiuse**, por não medirem esforços para a minha formação, sempre me apoiando e incentivando. Amo vocês!

Ao meu orientador Prof. Dr. **Ricardo Pereira Ribeiro**, pela confiança, ensinamentos, paciência, oportunidades, amizade e incentivo constante. Uma pessoa de caráter admirável, exemplo de vida, bondade e honestidade.

Ao meu coorientador e amigo prof. Dr. **Danilo Pedro Streit Junior**, pelos ensinamentos, paciência, correções, conselhos, exemplo de competência, dedicação e amizade.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **Maria Raquel Marçal Natali**, pelas preciosas correções, conselhos, ensinamentos, paciência, amizade e dedicação.

Ao Prof. Dr. **Carlos Antonio Lopes de Oliveira**, pelos ensinamentos estatísticos, paciência, e amizade.

Aos professores Dr. **Luiz Paulo Rigolon**, Dr. **Lauro Daniel Vargas Mendez**, Dr. **Luiz Alexandre Filho** e Dr. **Nelson Mauricio Lopera Barrero**, pela participação na banca de defesa e pelas valiosas sugestões em minha tese.

Às amigas **Juliana Minardi Galo, Pilar Rodriguez, Graciela de Lucca e Braccini, Kenny Monquero**, pela amizade, apoio e incentivo. Às amigas **Grazyella Yoshida, Camila Muniz, Natali Miwa Kunita, Monica Merenda**, pela amizade, apoio e especialmente ajuda nas coletas, minhas *experts* na contagem de oócitos e embriões. Em especial ao **Thiago Fontolan Tardivo**, pelo auxílio e por ter ajudado a tornar possível minhas coletas.

A todos colegas e amigos do grupo **PeixeGen e Aquam**, pelos bons momentos de descontração, troca de conhecimentos e auxílio nos trabalhos. E, aos amigos do **Laboratório de Reprodução de Peixes do CAUNESP**, pelos momentos de descontração e troca de conhecimentos.

Em especial ao **Patrick Hainfellner**, que me auxiliou tanto na vida pessoal quanto na vida profissional, colaborando nas coletas de dados e processamento histológico! Obrigada por toda ajuda, suporte, conselhos, força, paciência, amor, carinho. Te Amo!

A todos meus familiares e a **Rosa S.Y. Hainfellner**, por todo apoio e incentivo.

À Piscicultura Buriti, em nome do **Sr José Mário Mendez**, pela disponibilidade da estrutura e confiança, tornando possível meu trabalho.

À Fazenda Aquicultura São Paulo, em nome da **Sra Miyuki Hyashida**, pela confiança, disponibilidade de estrutura, possibilitando meu trabalho.

A todos os funcionários da **Piscicultura Buriti e Fazenda e Aquicultura São Paulo**.

À **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria R. M. Natali** e as técnicas **Maria Eurides e Maria dos Anjos**, do Laboratório de Histotécnica Animal do Departamento de Ciências Morfológicas – UEM, por todo apoio e na captura das imagens de historesina.

Ao **Prof. Dr Sérgio Ricardo Batlouni** e ao doutorando **Patrick Hainfellner** do Laboratório de Reprodução de Peixes (CAUNESP-UNESP Jaboticabal), pelo auxílio e uso do micrótomo.

À técnica **Cláudia A. Rodrigues (Claudinha)** do Laboratório de Microscopia Eletrônica (FCAV-UNESP Jaboticabal), na análise em MEV.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPZ) e ao Departamento de Zootecnia (DZO), e funcionários do PPZ, **Denilson S. Vicentin**, e do DZO, **Elizabete dos Santos (Beth)** e **Francisco W. Oliveira**, pela atenção e disponibilidade.

Às técnicas do laboratório **Zeni Barbosa** e **Dilma Botter** e os funcionários da estação de piscicultura, **Vitor Moisés**, **José Geraldo** e **Cleiton dos Santos**.

À **Capes**, pela bolsa concedida durante meu doutorado.

Agradeço a todos que fizeram e fazem parte da minha caminhada e com certeza deixaram uma contribuição para minha vida...

“Agradecer ato que muitas vezes acaba sendo muito pequeno por tantas maravilhas que recebemos.”

*A todos Muito Obrigada!*

## BIOGRAFIA

Melanie Digmayer, filha de Robert Digmayer e Doralice Matiuse, nasceu em Maringá, Estado do Paraná, no dia 24 de maio de 1984.

Em fevereiro de 2007, concluiu o Curso de Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá – UEM – em Maringá, Paraná.

Em março de 2010, 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 2010, iniciou no 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 01 de outubro de 2013, submeteu-se à banca para defesa da tese.

## ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO I.....	1
I - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Situação da piscicultura mundial e brasileira: peixes redondos.....	1
1.2 Espécies.....	2
1.2.1 <i>Colossoma macropomum</i> .....	2
1.2.2 <i>Piaractus brachypomus</i> .....	2
1.3 Oócitos e embriões de peixes.....	3
1.4 Criopreservação.....	5
1.4.1 Avaliação da sensibilidade oocitária.....	6
1.4.2 Soluções crioprotetoras.....	8
1.5 Citação bibliográfica.....	9
OBJETIVOS GERAIS.....	14
CAPÍTULO II - SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS PARA OÓCITOS DE <i>Colossoma macropomum</i> .....	15
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	16
Introdução.....	17
Material e Métodos.....	18
Origem dos oócitos utilizados no estudo.....	18

Experimento 1. Avaliação dos oócitos nas soluções crioprotetoras .....	18
Experimento 2. Avaliação dos oócitos submetidos à congelação lenta.....	19
Análise morfológica.....	20
Análise estatística.....	20
Resultados.....	21
Experimento 1. Avaliação dos oócitos nas soluções crioprotetoras.....	21
Experimento 2. Avaliação dos oócitos submetidos a congelação lenta.....	22
Discussão.....	24
Referências.....	26
<b>CAPÍTULO III – CRIOPRESERVAÇÃO DE OÓCITOS E EMBRIÕES DE</b>	
<i>Piaractus brachypomus</i> .....	28
RESUMO.....	29
ABSTRACT.....	30
Introdução.....	30
Material e Métodos.....	32
Experimento 1. Congelação de oócitos de <i>P. brachypomus</i> .....	32
Avaliação da sensibilidade dos oócitos.....	32
Processamento Histológico em Histoiresina.....	33
Avaliação da sensibilidade dos oócitos a congelação lenta.....	34
Processamento para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	34
Experimento 2. Congelação de embriões de <i>P. brachypomus</i> .....	34
Congelação de embriões a -13°C por oito horas.....	34
Congelação de embriões em nitrogênio líquido.....	36
Análise estatística.....	37
Resultados.....	37
Experimento 1. Congelação de oócitos de <i>P. brachypomus</i> .....	37
Avaliação da sensibilidade dos oócitos.....	37
Avaliação da sensibilidade dos oócitos a congelação lenta.....	38
Experimento 2. Congelação de embriões de <i>P. brachypomus</i> .....	39
Congelação de embriões a -13°C por oito horas.....	39
Congelação de embriões em nitrogênio líquido.....	42
Discussão.....	43
Oócitos.....	43
Embriões.....	44

Referências.....	46
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48

## LISTA DE TABELAS

	Páginas
<b>SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS PARA OÓCITOS DE <i>Colossoma macropomum</i></b>	
Tabela 1. Molaridade dos crioprotetores interno (metanol) e externos (sacarose, trealose e frutose) das soluções crioprotetoras para oócitos de <i>C. macropomum</i> .....	19
Tabela 2. Percentual de embriões mortos, desenvolvidos e larvas vivas após a eclosão de embriões provenientes dos diferentes tratamentos de sensibilidade dos oócitos de <i>C. macropomum</i> à soluções crioprotetoras em temperatura (30°C).....	22
Tabela 3. Contrastes testados entre sacarose vs trealose (C1), sacarose vs frutose (C2) e trealose vs frutose (C3) nos diferentes tratamentos de sensibilidade dos oócitos de <i>C. macropomum</i> às soluções crioprotetoras em temperatura (30°C).....	22
<b>CRIOPRESERVAÇÃO DE OÓCITOS E EMBRIÕES DE <i>Piaractus brachyomus</i></b>	
Tabela 1. Composição dos crioprotetores internos (metanol e DMSO) e externo (sacarose) das soluções crioprotetoras para oócitos de <i>Piaractus brachyomus</i> .....	33
Tabela 2. Composição das soluções crioprotetoras para embriões de <i>P. brachyomus</i> , submetidos a congelamento (-13°C).....	35
Tabela 3. Composição das soluções crioprotetoras para embriões de <i>P. brachyomus</i> , submetidos a congelamento em nitrogênio líquido.....	36
Tabela 4. Probabilidade de ocorrência de embriões desenvolvidos e embriões mortos de <i>P. brachyomus</i> após submissão dos oócitos em diferentes tratamentos com solução crioprotetora em temperatura ambiente (28,4°C).....	38
Tabela 5. Probabilidade de ocorrência de embriões desenvolvidos e embriões mortos, após a incubação dos embriões de <i>P. brachyomus</i> que permaneceram por oito horas a -13°C em diferentes soluções crioprotetoras.....	39

## LISTA DE FIGURAS

	Páginas
INTRODUÇÃO	
Figura 1. Fotomicrografia de oócito de <i>Prochilodus lineatus</i> recém-extrusado, corado com azul de toluidina/fucsina básica, aumento de 40X (Adaptado de Freire Brasil et al., 2003).....	3
Figura 2. Imagem de um embrião de teleósteo, evidenciando seus principais compartimentos (Adaptado de Hagedorn et al., 1997).....	4
SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS PARA OÓCITOS DE <i>Colossoma macropomum</i>	
Figura 1. Embrião morto (A), desenvolvido (B) e larva viva (C) de <i>C. macropomum</i> , após a avaliação da sensibilidade em temperatura ambiente. Imagem obtida em estereomicroscópio com aumento de 20X.....	21
Figura 2. Fotomicrografia de oócitos de <i>C. macropomum</i> criopreservados com solução de metanol 1,6M e sacarose 0,25M, evidenciando vitelo (V) e zona radiata (ZR). Hematoxilina-Floxina.....	23
Figura 3. Eletromicrografia de oócitos de <i>C. macropomum</i> criopreservados com solução de metanol 1,6M e sacarose 0,25M evidenciando micrópila (M), zona radiata (ZR) e poros (seta).....	24
CRIOPRESERVAÇÃO DE OÓCITOS E EMBRIÕES DE <i>Piaractus brachypomus</i>	
Figura 1. Embrião de <i>P. brachypomus</i> em estágio de 90 % de epibolia (esquerda) e embrião morto (direita). Imagem obtida em estereomicroscópio com aumento de 20X.....	35
Figura 2. Oócitos e embriões de <i>P. brachypomus</i> . Oócito (A) (coloração com hematoxilina-floxina), embrião em desenvolvimento (B) e embrião morto (C) (estereomicroscópio com aumento de 20X). Evidenciando vitelo (v), zona radiata (zr), embrião (e), espaço perivitelino (ep), córion (c), blastoderme (b).....	37
Figura 3. Fotomicrografia de oócitos de <i>P. brachypomus</i> criopreservados com solução de 1,6M metanol + 0,25M sacarose + solução de Hank (T5), coradas com hematoxilina-floxina (A, B) e em MEV (C). Vitelo (v) e zona radiata (zr).....	39
Figura 4. Fotomicrografia de embriões de <i>P. brachypomus in natura</i> (A, B), após permanecerem oito horas a -13°C em solução de metanol 3,1M e	

<p>sacarose 0,45M (C, D), metanol 3,1M e sacarose 1,0M (E, F),  metanol 3,1M e PVP 0,6M (G, H). Corados com hematoxilina-floxina.  Blastoderme (B), vitelo (V) e córion (cabeça de seta). Aumento de  40X (figuras A, C, E e G) e 200X (figuras B, D, F e H).....</p>	41
<p>Figura 5. Fotomicrografia de embriões de <i>P. brachypomus</i> após congelação em  solução de metanol 3,1M e sacarose 0,45M (A), metanol 3,1M e  sacarose 0,63M (B), metanol 3,1M e sacarose 0,81M (C), e metanol 3,1M  e sacarose 1,0M (D). Blastoderme (b), vitelo (V) e córion (cabeça de seta).  Corados com hematoxilina-floxina, em aumento de 40X.....</p>	42

## RESUMO

O objetivo neste trabalho foi desenvolver metodologias de criopreservação de oócitos de *Colossoma macropomum*, e oócitos e embriões de *Piaractus brachypomus*, analisar as injúrias causadas nos oócitos e embriões após a exposição às soluções crioprotetoras e criopreservação. Os oócitos de *C. macropomum* foram distribuídos em seis soluções crioprotetoras: T1- metanol 1,6M + sacarose 0,25M; T2- metanol 1,6M + sacarose 0,5M; T3- metanol 1,6M + trealose 0,25M; T4- metanol 1,6M + trealose 0,5M; T5- metanol 1,6M + frutose 0,25M; T6- metanol 1,6M + frutose 0,5M e T7- controle de eclosão. Os oócitos foram mantidos nas soluções crioprotetoras por 20 minutos, em temperatura ambiente, fertilizados e levados às incubadoras. A segunda parcela dos oócitos foi submetida à congelação lenta, armazenada em nitrogênio líquido, descongelada, sendo parte fixada e outra parte fertilizada e mantidas em incubadoras. A probabilidade de ocorrer sobrevivência dos oócitos submetidos ao T1, em temperatura ambiente foi maior (15,8%). Quanto à sobrevivência depois de eclodidas as larvas, não houve diferença entre os tratamentos. Na fertilização dos oócitos que passaram pela congelação lenta não foi obtida eclosão das larvas. Foi verificada preservação morfológica nos T1 e T2 cuja solução crioprotetora continha metanol 1,6M e sacarose 0,25 e 0,50M, respectivamente. Os oócitos de *Piaractus brachypomus* foram distribuídos em oito soluções crioprotetoras: T1- metanol 1,6M + sacarose 0,25M + 50% L15; T2- metanol 3,1M + sacarose 0,25M + 50% L15; T3- DMSO 0,7M + sacarose 0,25M + 50% L15; T4- DMSO 1,3M + sacarose 0,25M + 50% L15; T5- metanol 1,6M + sacarose 0,25M + Hank; T6- metanol 3,1M + sacarose 0,25M + Hank; T7- DMSO 0,7M + sacarose 0,25M + Hank; T8- DMSO 1,3M + sacarose 0,25M + Hank. Os embriões congelados a -13°C foram distribuídos em oito soluções

crioprotetoras: T1- metanol 3,1M + PVP 0,15M + Hank; T2- metanol 3,1M + PVP 0,3M + Hank; T3- metanol 3,1M + PVP 0,45M + Hank; T4- metanol 3,1M + PVP 0,6M + Hank; T5- metanol 3,1M + sacarose 0,45M + Hank; T6- metanol 3,1M + sacarose 0,63M + Hank; T7- metanol 3,1M + sacarose 0,81M + Hank; T8- metanol 3,1M + sacarose 1,0M + Hank. Os embriões congelados em nitrogênio líquido foram distribuídos em quatro soluções crioprotetoras: T1- metanol 3,1M + sacarose 0,45M + Hank; T2- metanol 3,1M + sacarose 0,63M + Hank; T3- metanol 3,1M + sacarose 0,81M + Hank; T4- metanol 3,1M + sacarose 1,0M + Hank. Para análise morfológica foram processados oócitos e embriões em historesina e oócitos para técnica de microscopia eletrônica de varredura. Dos oócitos de *P. brachypomus* mantidos em temperatura ambiente e fertilizados, os tratamentos que apresentaram desenvolvimento embrionário foram o T5 (metanol 1,5M, sacarose 0,25 M e solução de Hank), 17,3% e T7 (DMSO 0,7M, sacarose 0,25 M e solução de Hank), 1,8%. Na fertilização dos oócitos submetidos à curva de congelação lenta não houve desenvolvimento embrionário após a fertilização. Na avaliação morfológica, verificou-se que os oócitos de *P. brachypomus* submetidos a congelação lenta quando na solução crioprotetora com 1,6M metanol+ 0,25M sacarose + solução de Hank (T5) apresentaram a zona radiata íntegra e com contorno regular. Dos embriões que foram submetidos à congelação a -13°C, no T5, 15,3% dos embriões se desenvolveram e foi significativamente maior que no T6 (4,6%), T3 (1,5%), T7 (1,8%) e T8 (1,9%) e também houve desenvolvimento embrionário. Nos demais tratamentos, todos os embriões submetidos às soluções crioprotetoras em temperatura de -13°C e os embriões submetidos aos tratamentos em nitrogênio líquido resultaram em embriões mortos. Nenhum tratamento com oócitos de *C. macropomum* e oócitos e embriões de *P. brachypomus* proporcionou manutenção da capacidade fecundante após a congelação.

**Palavras-chave:** congelação, injúrias embrionárias, pirapitinga, tambaqui.

## ABSTRACT

The aim of this work was to develop methods for cryopreservation of *Colossoma macropomum* oocytes and oocytes and embryos of *Piaractus brachypomus*, as well as to analyze the damages in oocytes and embryos after exposure to cryoprotectant solutions and cryopreservation. Oocytes of *C. macropomum* were distributed in six cryoprotectant solutions: T1 -methanol 1.6 M + sucrose 0.25 M, T2 - methanol 1.6 M + sucrose 0.5 M, T3 - methanol 1.6 M + trehalose 0.25 M, T4 - methanol 1.6 M + trehalose 0.5 M, T5 - methanol 1.6 M + fructose 0.25 M, T6 - methanol 1.6 M + fructose 0.5 M and T7 – outbreak control. Oocytes were kept in cryoprotectant solutions for 20 minutes at room temperature, fertilized and taken to incubators. A second portion of the oocytes were underwent to slow freezing, stored in liquid nitrogen, thawed, and a part was fixed while the other was fertilized and kept in incubators. The survival probability of oocytes subjected to T1 at room temperature was higher (15.8%). As for survival after hatched larvae, there was no difference between treatments. In the fertilization of oocytes that passed by slow freezing there was not hatching. Morphological preservation was observed in T1 and T2 with cryoprotectant solution containing methanol 1.6 M and sucrose 0.25 and 0.50 M, respectively. The oocytes of *Piaractus brachypomus* were distributed in eight cryoprotectant solutions: T1 - methanol 1.6 M + sucrose 0.25 M + 50 % L15, T2 -methanol 3.1 M + sucrose 0.25 M + 50 % L15, T3 - DMSO 0.7M + sucrose 0.25 M + 50% L15, T4 - DMSO 1.3 M + sucrose 0.25 M + 50% L15, T5 -methanol 1.6 M + sucrose 0.25 M + Hank, T6 - methanol 3.1 M + sucrose 0,25M + Hank, T7 -DMSO 0.7 M + sucrose 0.25 M + Hank, T8 - DMSO 1.3 M + sucrose 0.25 M + Hank. The embryos frozen at -13°C were distributed in eight cryoprotectant solutions: T1 - methanol 3.1M + 0.15M PVP + Hank,

T2 - methanol 3.1 M + PVP 0.3 M + Hank, T3 - methanol 3.1 M + PVP 0,45M + Hank, T4 - methanol 3.1 M + PVP 0.6 M + Hank, T5 -methanol 3.1 M + sucrose 0.45 M + Hank, T6 - methanol 3.1 M + sucrose 0.63 M + Hank, T7 - methanol 3.1 M + sucrose 0.81 M + Hank, T8 - methanol 3.1 M + sucrose 1.0 M + Hank. Embryos frozen in liquid nitrogen were distributed in four cryoprotectant solutions: T1 - methanol 3.1 M + sucrose 0.45 M + Hank, T2 - methanol 3.1 M + sucrose 0.63 M + Hank, T3 - methanol 3.1 M + sucrose 0.81M + Hank, T4 - methanol 3.1 M + sucrose 1.0 M + Hank. For morphological analysis oocytes and embryos were processed in historesin and oocytes for scanning electron microscopy technique. For oocytes of *P. brachypomus* kept at room temperature and fertilized treatments that showed embryo development were T5 (methanol 1.5 M, sucrose 0.25 M solution and Hank), 17.3% and T7 (DMSO 0.7 M, sucrose 0.25 M and Hank) 1.8%. In fertilization of oocytes subjected to slow freezing curve there was not embryo development after fertilization. In the morphological analysis it was found that the oocytes of *P. brachypomus* when subjected to slow freezing in extender solution with methanol 1.6 M + sucrose 0.25 M + solution hank (T5) showed a full zona radiata with regular contour. From embryos that were underwent freezing at -13°C in T5, 15.3% developed and was significantly higher than in T6 (4.6%), T3 (1.5%), T7 (1.8%) and T8 (1.9%) and there was also embryo development. In other treatments, all embryos subjected to cryoprotectant solutions at a temperature of -13°C and embryos subjected to treatments in liquid nitrogen resulted in dead embryos. No treatment with oocysts of *C. macropomum* and oocytes and embryos of *P. brachypomus* provided maintenance of fertilizing capacity after freezing.

Key words: freezing, embryonic injuries, pirapitinga, tambaqui.

# CAPÍTULO I

## INTRODUÇÃO

### *1.1 Situação da piscicultura mundial e brasileira: peixes redondos*

A aquicultura continental nacional é o setor de produção de alimentos de origem animal com crescimento mais elevado no Brasil, chegando a 544.490t no ano de 2011, o que representa aumento de 38,1% em relação à produção de 2010 (MPA, 2013). A produção de peixes redondos (gênero *Piaractus* e *Colossoma* e seus híbridos) corresponde a 38% da quantidade de peixes nativos cultivados (IBAMA, 2007).

O crescimento na produção de peixes tem refletido no interesse de inúmeras atividades acerca do planejamento da atividade de piscicultura, na área de biotecnologia, que por inúmeras vezes são utilizados no desenvolvimento de atividades relacionadas à piscicultura. A criopreservação é considerada uma poderosa ferramenta para viabilizar, inclusive programas de melhoramento genético (cruciais para o desenvolvimento zootécnico das espécies), além da preservação da diversidade de espécies e na aquicultura (Guan et al., 2008). Uma das vantagens da utilização de criobancos de genes vivos diz respeito que parte da representação genética dos reprodutores pode ser estocada para ser utilizada posteriormente, no momento que for de interesse, para pesquisa ou conservação e preservação da biodiversidade genética dos recursos aquáticos (Rana, 1995).

A criopreservação de germoplasma inclui a preservação de sêmen, oócitos e embriões e pode auxiliar a conservação *ex situ*, preservando os genomas de espécies ameaçadas ou em extinção, podendo permitir a existência de populações no futuro (Tsai e Lin, 2012), dos recursos genéticos, para aplicação comercial, possibilitando o transporte de material genético entre longas distâncias, sem necessitar do deslocamento dispendioso e estressante de matrizes, bem como na aquicultura em geral (Leverone Calvi e Maisse, 1998; Tsai et al., 2009).

Muito embora ainda não tenha ocorrido sucesso na criopreservação de oócitos e embriões de peixes, a atual necessidade de preservação genética de gametas maternos e embriões tem incentivado a busca por protocolos de criopreservação efetivos (Zhang e Rawson, 2007; Robles et al., 2009).

## 1.2 Espécies

### 1.2.1 *Colossoma macropomum*

O tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier,1818), pertence a família Characidae e ocorre naturalmente nas bacias do rio Amazonas e rio Orinoco, e vive em águas ricas em nutrientes, com temperatura entre 25 e 34°C (Araújo-Lima e Gomes, 2005). É uma espécie reofílica e seu período reprodutivo ocorre na época das chuvas, entre outubro e março (Ventueri e Bernardino, 1999). É considerado o segundo maior peixe de escamas da bacia Amazônica, podendo atingir 30 quilos, segundo registros na natureza (Kubitza, 2004).

A produção brasileira de *C. macropomum* no ano de 2011 foi de 111.084,1 toneladas, que equivale a 20,4% da produção total da aquicultura continental. Com um grande potencial para a aquicultura, o *C. macropomum* se destaca dentre os grupos de espécies mais cultivadas no Brasil, em virtude de sua textura e sabor da carne, sendo a principal espécie de peixe cultivada na região Norte (Cartonilho e Jesus, 2011), e sendo cultivada em 90% dos estados brasileiros (Lopera-Barrero et al., 2011). A partir de suas qualidades zootécnicas, a espécie foi escolhida para iniciar um programa de melhoramento genético no Brasil (Resende et al., 2010), bem como estudos de criopreservação de sêmen e qualidade dos gametas (Galo, 2013).

### 1.2.2 *Piaractus brachypomus*

*Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818), conhecida como pirapitinga e pertencente à família Characidae, é uma espécie nativa da América do Sul, com distribuição nos rios Solimões-Amazonas, Orinoco e seus respectivos afluentes. Espécie migradora, seu período reprodutivo se inicia pouco antes da época das chuvas e sua desova é total (Vásquez-Torres, 2005). É considerada a terceira maior espécie de escamas da Amazônia, podendo atingir 20 quilos (Kubitza, 2004).

É uma espécie muito apreciada e cultivada na Colômbia, sendo considerada uma espécie de alto potencial produtivo e comercial na piscicultura extensiva, semi-intensiva e intensiva da América Tropical (Suárez et al., 2008). A produção brasileira de *P. brachypomus* no ano de 2011 foi de 9.858,7 toneladas, equivalendo a 2% da produção total da aquicultura continental. É cultivada em regiões de altas temperaturas e bastante utilizada em cruzamento com fêmea de *Colossoma macropomum* para obtenção do híbrido tambatinga.

### 1.3 Oócitos e embriões de peixes

Em teleósteos, os oócitos possuem uma área especializada chamada de micrópila, que é caracterizada como uma depressão na zona radiata (Ganeco e Nakaghi, 2003) e considerada um canal único que faz a conexão entre o meio externo e interno do oócito, que está ligado à superfície do polo animal, permitindo a fertilização pelo espermatozoide (Zelazowska, 2010).

A figura 1 representa um oócito de teleósteo neotropical, no momento da extrusão, com vitelo coalescido na região do polo vegetativo, e íntegro na região do polo animal, e concentração do citoplasma nessa região. A camada que envolve o oócito é chamada de zona radiata, ou também de córion (Freire Brasil et al., 2003).

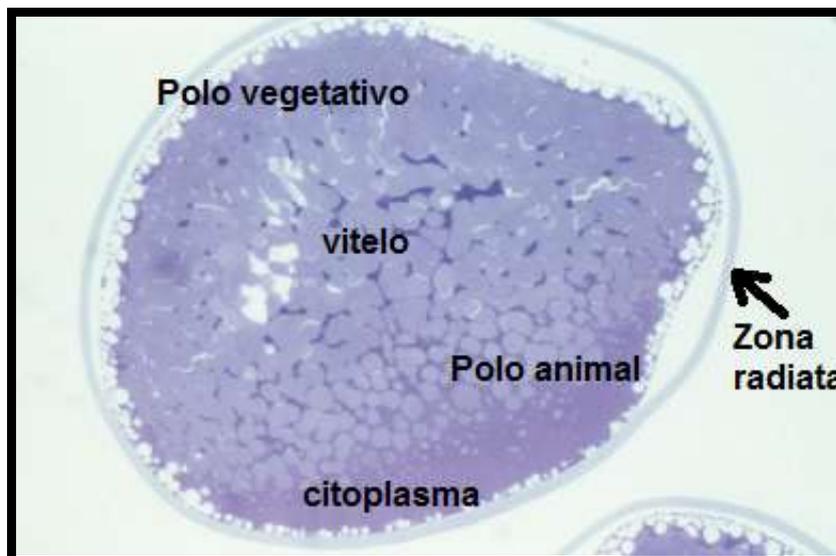


Figura 1. Fotomicrografia de oócito de *Prochilodus lineatus* recém-extrusado, corado com azul de toluidina/fucsina básica, aumento de 40X (Adaptado de Freire Brasil et al., 2003).

A morfologia da micrópila, bem como o arranjo dos poros ou canais da zona radiata são características espécie-específicas que podem ser observadas na superfície de oócitos recém-desovados (Riehl, 1993).

A Figura 2 representa um embrião e estruturas extraembrionárias de teleósteo evidenciando os principais compartimentos: córion, blastoderme, camada sincicial vitelínica e vitelo.

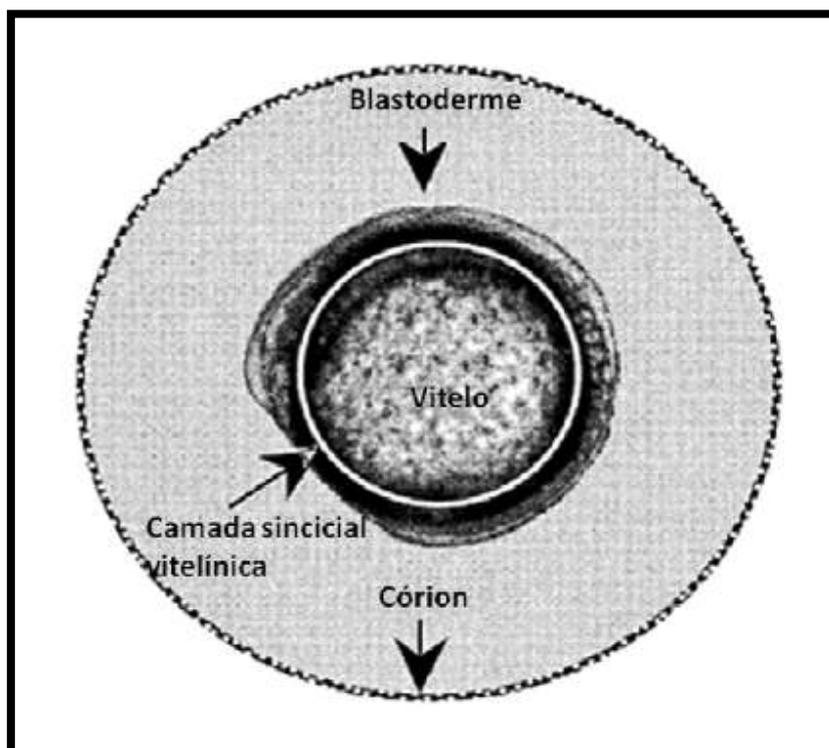


Figura 2. Imagem de um embrião de teleósteo, evidenciando seus principais compartimentos (Adaptado de Hagedorn et al., 1997).

Os ovos de teleósteos, inclusive do *C. macropomum* e *P. brachypomus* são telolécitos, pelo fato do vitelo estar concentrado no polo vegetativo, com citoplasma e suas organelas localizadas no polo animal. Além disso, é visível a diferença entre os dois polos animal e vegetal, após o processo de hidratação dos mesmos (Kimmel et al., 1995; Ribeiro et al., 1995).

A clivagem dos ovos de *C. macropomum* e *P. brachypomus* é do tipo meroblástica ou parcial, ocorrendo apenas no polo animal. Essa clivagem também é típica dos ovos de peixes como *Brycon orbignyanus* (Ganeco e Nakaghi, 2003), *Piaractus mesopotamicus* e seu híbrido (Ribeiro et al., 1995).

## 1.4 Criopreservação

O processo de criopreservação consiste na conservação do material biológico em temperaturas ultrabaixas, com a finalidade de suspender o metabolismo e manter as células viáveis por um período de estocagem indeterminado, possibilitando a utilização posterior, assim continuando seu desenvolvimento, sem a perda da sua viabilidade (Pegg, 2007).

A conservação de gametas e embriões de peixes é um valioso recurso para a administração de programas reprodutivos e para a preservação de estoques genéticos de espécies que possam estar em risco de extinção (Komrakova e Holtz, 2009). O sucesso da criopreservação de gametas de peixes pode beneficiar o fornecimento e banco de germoplasma global, a aquicultura, os recursos de conservação aquática e as pesquisas científicas (Liu et al., 2001; Cabrita et al., 2003).

Uma das aplicações da criopreservação é a disseminação de indivíduos de alto valor genético e grande produtividade (Wu et al., 2006), além de preservação do material genético de animais ameaçados de extinção (Wanderley et al., 2012). Nos últimos anos, tem-se aumentado a necessidade da conservação de gametas, para gestão de reprodutores e programas de melhoramento genético. Segundo Robles et al. (2009), a criopreservação de embriões pode representar a melhor opção para a conservação de germoplasma materno e paterno.

Há décadas se tem buscado protocolos que obtivessem sucesso na criopreservação de oócitos e embriões. O primeiro acontecimento foi registrado em 1977 por Whittingham, verificando que não houve perda na viabilidade de embriões de rato com oito células, após ficarem armazenados por quatro anos em nitrogênio líquido (-196°C).

Em estudo com *Brachydanio rerio*, Harvey (1983) comparou a sobrevivência de embriões após resfriamento e embriões que tiveram formação de gelo intracelular durante o processo de resfriamento, e constatou que essa formação de gelo é, provavelmente, o principal fator de limitação da sobrevivência dos embriões. Assim, a prevenção da formação de cristais de gelo nas células ou tecidos é necessária para o sucesso na criopreservação e sobrevivência dos oócitos e embriões.

Em um estudo de resfriamento (-8°C por seis horas) de embriões de *Colossoma macropomum* em que foram testados metanol, glicerol, etilenoglicol e DMSO em concentrações de 10%, associados a duas concentrações de sacarose (8,5 e 17%), Fornari (2012) verificou que a solução crioprotetora que proporcionou a maior taxa de

sobrevivência dos embriões após incubação foi de 10% metanol associado a 17% sacarose.

A tecnologia da criopreservação pode ser realizada por diferentes métodos, entre eles estão a congelação a temperaturas próximas a 0°C, também chamado de resfriamento (Lopes et al., 2011), que interrompe o metabolismo da célula viva, e conserva o material por um determinado período de tempo. Outro método utilizado é a congelação lenta (Tsai et al., 2009), no qual o material biológico é conservado em nitrogênio líquido (-196°C) interrompendo o metabolismo da célula viva, e a viabilizando por tempo indeterminado.

No método de congelação lenta, as células são expostas a baixas concentrações de crioprotetores por até uma hora e submetidos ao congelador programável estabilizado na temperatura de -5°C. Seguidamente se realiza a cristalização manual com objeto metálico, congelado em nitrogênio líquido e resfriando lentamente (0,5°C/min) até -32°C, para em seguida serem transferidas para o botijão de nitrogênio líquido (-196°C).

Cada tipo de célula, embriões ou oócitos, possui uma permeabilidade celular, sugerindo que o procedimento de criopreservação para diferentes células deve ser realizado individualmente. Quando as células são expostas a água e crioprotetores, ocorre um fluxo desses constituintes entre as membranas celulares, para isso, essas membranas precisam ser permeáveis a essas soluções (Hagedorn et al., 1997). Outro fator importante é a taxa de congelação ótima, pois se a taxa de congelação for muito rápida, pode não haver tempo suficiente para a desidratação celular, o que causaria um congelamento celular e conseqüentemente lise da célula pela formação de gelo intracelular. Por outro lado, se a taxa de congelação for muito lenta, pode haver uma excessiva desidratação celular, o que causaria danos irreparáveis nos oócitos e embriões (Mazur, 1963; 1984; Rall, 1992).

#### *1.4.1 Avaliação da sensibilidade oocitária*

As funções biológicas dos tecidos podem ser influenciadas pelo estresse químico, mecânico e térmico. Apesar da preservação dos tecidos à temperatura de -196°C ser supostamente ilimitada, as fases de congelação e descongelação podem ser nocivas às células (Bakhach, 2009), além da toxicidade das soluções crioprotetoras utilizadas. Em temperaturas próximas de 0°C, os embriões de peixes são susceptíveis às crioinjúrias em razão da formação de cristais de gelo e por conseqüência rompimento das membranas celulares (Adams et al., 2003).

A sensibilidade dos oócitos e embriões a baixas temperaturas é específica para cada espécie e em diferentes tipos de células (Zhang et al., 2003; Valdez et al., 2005). A avaliação dos danos causados pela criopreservação é de grande relevância, pois pode ser utilizada para caracterizar a intensidade das lesões celulares, que podem incapacitar as células de superarem os danos e perderem sua viabilidade (Carvalho et al., 2012).

A qualidade do oócito e embrião antes de serem submetidos ao processo de congelação pode influenciar o sucesso da criopreservação. A qualidade dos oócitos de peixes pode ser definida como sua capacidade de serem fertilizados e se desenvolverem em embriões normais (Bobe e Labbé, 2010). Assim, a avaliação da taxa de eclosão dos embriões é um dos indicativos de qualidade dos oócitos que pode ser utilizado após a criopreservação. Pela sua menor dimensão e sensibilidade a baixas temperaturas e à toxicidade das soluções crioprotetoras, além da ausência de córion integralmente formado (o que pode torná-los mais permeáveis à água e solutos) os oócitos de peixes possuem algumas vantagens em relação a outras espécies, especialmente nas fases iniciais de desenvolvimento (Zhang e Rawson, 2007; Tsai e Lin, 2012). Isayeva et al. (2004) indicaram que a sensibilidade dos oócitos de *zebrafish* ao resfriamento pode ser um dos fatores limitantes do sucesso no desenvolvimento de um protocolo de criopreservação, pois conforme se reduz a temperatura é também reduzida a sobrevivência dos oócitos.

Até o momento não há relato de sucesso na congelação de oócitos de peixes. Uma das explicações para esse insucesso se deve ao fato da área de superfície do oócito ser bem menor que seu volume, e faz com que a taxa de troca de água e crioprotetor seja reduzida (Tsai e Lin, 2012). Do mesmo modo que na criopreservação de oócitos, na criopreservação de embriões de peixes também não foi possível a obtenção de sucesso. Alguns autores indicam que esse insucesso se deve a morfologia do embrião, além de serem considerados grandes, possuem um complexo sistema de compartimentos, elevado teor de água, alta sensibilidade à baixa temperatura, grande quantidade de vitelo e baixa permeabilidade de membrana (Robles et al., 2004), somam-se a esses fatos as diferentes propriedades osmóticas dos compartimentos embrionários (Hagedorn et al., 1998). O resfriamento de embriões de peixes, como o pacu, é possível segundo alguns estudos, e os mesmos autores indicam que o estágio de fechamento do blastoporo parece ser o menos sensível ao resfriamento (Streit Junior et al., 2007; Lopes et al., 2011).

De modo geral, as células podem suportar o armazenamento em baixas temperaturas (como  $-196^{\circ}\text{C}$ ) por vários anos, o desafio é determinar como passar pelo resfriamento e pelo retorno às condições fisiológicas normais, sem provocar a inviabilidade da mesma (Li et al., 2009).

#### *1.4.2 Soluções crioprotetoras*

Hagedorn e Kleinhans (2000) sugeriram que para o sucesso da criopreservação de embriões, a célula deve ter água osmoticamente ativa e um crioprotetor apropriado deve penetrar na célula, considerando que as funções básicas de um bom crioprotetor são: não ser tóxico, ajudar na estabilidade das membranas e reduzir a formação intracelular de cristais de gelo. Para reduzir os danos tóxicos e osmóticos ocorridos durante o processo de congelação e descongelação, preconiza-se o uso de crioprotetores menos tóxicos e da combinação entre eles, permitindo que a concentração do crioprotetor seja reduzida (Green, 2005). A classificação dos crioprotetores está baseada em sua capacidade de permear as membranas celulares, sendo denominados de internos ou externos.

Os crioprotetores internos ou penetrantes como o metanol, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol, glicerol, entre outros, geralmente são de baixo peso molecular e permeiam as células mais facilmente retirando a água, sendo responsáveis por proteger as organelas das células durante o resfriamento e reaquecimento. Crioprotetores externos ou não penetrantes como a sacarose, frutose, trealose e polivinilpirrolidona (PVP) geralmente são moléculas de alto peso molecular e normalmente não penetram a membrana durante um curto intervalo de exposição, e são responsáveis por reduzir a formação de gelo, facilitar a desidratação e proteger a membrana celular (Niemann, 1991; Denniston et al., 2000).

O metanol, crioprotetor de maior permeabilidade intracelular e menor toxidez em diferentes espécies de peixes, tem estimulado a realização de diversos estudos na criopreservação de embriões de peixes (Zhang e Rawson, 1995; Ahammad et al., 1998; Streit Junior et al., 2007). Já o DMSO possui características importantes, como baixo peso molecular e elevada permeabilidade celular, mas pode causar danos por choque osmótico e toxidez (He e Woods III, 2003). Independente do crioprotetor, Leibo (1984) sugeriu que a sacarose é capaz de regular a velocidade de entrada e de saída do crioprotetor interno em embriões bovinos, mantendo a concentração constante do meio extracelular e evitando desse modo o choque osmótico.

Quanto à utilização de crioprotetores externos, os resultados obtidos por inúmeros pesquisadores sugerem ser imprescindível a sua utilização. Tradicionalmente nos protocolos com embriões de peixes como o pacu, a sacarose tem sido altamente eficiente, como registraram, Streit Junior et al. (2007), Digmayer (2010) e Lopes et al. (2011). A sacarose e a frutose atuam no aumento da pressão osmótica, provocando a desidratação celular e conseqüente redução na formação de gelo intracelular (Silva e Guerra, 2011). Leite et al. (2011) verificaram que a utilização da frutose na composição da solução proporcionou melhor resultado na motilidade espermática do sêmen bovino congelado. Já a polivinilpirrolidona (PVP) é uma macromolécula de polímero sintético, efetiva na congelação de embriões (Leibo e Oda, 1993). Também tem sido mais efetiva na taxa de eclosão de embriões de *Scophthalmus maximus* após exposição em soluções contendo PVP (Cabrita et al., 2003).

Independente do crioprotetor utilizado a combinação de crioprotetores internos e externos na criopreservação de sêmen (Streit Junior et al., 2009, Galo et al., 2011) e resfriamento de embriões (Streit Junior et al., 2007; Fornari et al., 2011; Lopes et al., 2011), tem sido realizada com sucesso em diferentes espécies.

Devido a toxicidade química dos crioprotetores, a concentração utilizada é de extrema importância no processo de criopreservação, se for muito alta, pode causar danos as células. Além da concentração, o tempo de exposição da célula ao crioprotetor pode interferir em sua viabilidade (Vajta et al., 1998). As rápidas taxas de resfriamento podem diminuir as injúrias celulares, através da passagem direta pela zona de risco do resfriamento, que está entre 15°C e -5°C (Martino et al. 1996).

### 1.5 Citação bibliográfica

Adams, S.L., Kleinhans, F.W., Mladenov, P.V., Hessian, P.A. (2003). Membrane permeability characteristics and osmotic tolerance limits of sea urchin (*Evechinus chloroticus*) eggs. *Cryobiology*, v.47, p.1-13.

Ahammad, M.M., Bhattacharyya, D., Jana, B.B. (1998). Effect of different concentrations of cryoprotectant and extender on the hatching of Indian major Carp embryos (*Labeo rohita*, *Catla catla* and *Cirrhinus mrigala*) stored at low temperature. *Cryobiology*, v.37, p.318-324.

Araujo-Lima, C.A.R.M., Gomes, L.C. (2005). Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Baldisserotto, B., Gomes, L.C. Editores. Santa Maria, Ed. Da UFSM, 468p.

Bakhach, J. (2009). The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. *Organogenesis*, v.5, n.3, p.119-126.

Bobé, J., Labbé, C. (2010). Egg and sperm quality in fish. General and comparative endocrinology, v.165, p.535-548.

Cabrita, E., Robles, V., Chereguini, O., Wallace, J.C., Herráez, M.P. (2003). Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). Cryobiology, v.47, p.204-213.

Cartonilho, M.M., Jesus, R.S. (2011). Qualidade de cortes congelados de tambaqui cultivado. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.46, s.4, p.344-350.

Carvalho, A.A., Faustino, L.R., Castro, S.V., Figueiredo, J.R., Rodrigues, A.P.R. (2012). Caracterização dos danos celulares em gametas femininos e embriões após criopreservação. Acta Scientiae Veterinariae, v.40, s.3, p.1046.

Denniston, R.S., Michelet, S., Godke, R.A. (2000). Principles of cryopreservation. In: Cryopreservation in aquatic species. Tiersch, T.R., Mazik, P.M., Editors. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. Pp.59-74.

Digmayer, M. (2010). Viabilidade de embriões de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), submetidos a  $-8^{\circ}\text{C}$  e, diferentes concentrações de crioprotetores. Maringá. 46p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá.

Fornari, D.C. (2012). Crioconservação de embriões de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Maringá. 77p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá.

Fornari, D.C., Ribeiro, R.P., Streit Junior., D.P., Godoy, L.C., Neves, P.R., Oliveira, D., Sirol, R.N. (2011). Effect of cryoprotectants on the survival of cascudo preto (*Rhinelepis aspera*) embryos stored at  $-8^{\circ}\text{C}$ . Zygote, v.26, p.1-6.

Freire-Brasil, D., Grassiotto, I.Q., Nakaghi, L.S.O., Santos, H.S.L., Foresti, F. (2003). Análise morfológica da maturação final do ovócito em curimatá (*Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1836). CIVA 2003 (<http://www.civa2003.org>), p.383-398.

Galo, J.M., Streit Junior, D.P., Sirol, R.N., Ribeiro, R.P., Digmayer, M., Andrade, V.X.L., Ebert, A.R. (2011). Spermatic abnormalities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) after cryopreservation. Brazilian Journal of Biology, v.71, n.3, p.693-699.

Galo, J.M. (2013). Avaliação da qualidade dos gametas de tambaqui (*Colossoma macropomum*) ao longo da estação reprodutiva. Maringá. 89p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá.

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

Green, R.E. (2005). Princípios e técnicas da vitrificação de embriões dos animais domésticos. Botucatu. 21p. Monografia - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

Guan, M., Rawson, D.M., Zhang, T. (2008). Development of a new method for isolating zebrafish oocytes (*Danio rerio*) from ovary tissue masses. Theriogenology, v.69, p.269-275.

Hagedorn, M., Hsu, E., Kleinhans, F.W., Wildt, D.E. (1997). New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation. Cryobiology, v.34, p.335-347.

Hagedorn, M., Kleinhans, F.W., Artemov, D., Pilatus, U. (1998). Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo. Biology Reproduction, v.59, p.1240-1250.

Hagedorn, M., Kleinhans, F.W. (2000). Problems and prospects in cryopreservation of fish embryos. In: Cryopreservation in Aquatic Species. Tiersch, T.R., Mazik, P.M., Editors. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. p. 161-178.

Harvey, B. (1983) 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.

He, S., Woods III, L.C. (2003). Effects of glycine and alanine on short-term storage and cryopreservation of striped bass (*Morone saxatilis*) spermatozoa. Cryobiology, v.46, n.1, p.17-25.

IBAMA. (2007) Estatística da pesca 2005: Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Brasília: IBAMA. 137p.

Isayeva, A., Zhang, T., Rawson, D.M. (2004). Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. Cryobiology, v.49, p.114-122.

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F. (1995). Stages embryonic developmental of the zebrafish. Developmental Dynamics, v.203, p.253-310.

Komrakova, M, Holtz, W. (2009). Factors responsible for successful chilled storage of unfertilized rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. Aquaculture, v.286, p.156-163.

Kubitza, F. (2004). Coletânea de informações aplicadas ao cultivo do tambaqui, do pacu e de outros peixes redondos. Panorama da Aquicultura. Rio de Janeiro, v.14, n.82, p. 27-39, mar/abr.

Leibo, S.P. (1984). A one-step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. Theriogenology, v.21, p.767-790.

Leibo, S.P., Oda, K. (1993). High survival of mouse oocytes and embryos cooled rapidly or slowly in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone. Cryo-letters, v.14, p.133-144.

Leite, P.A., Schreder, G.G., Almeida, C.L.R., Zúccari, C.E.S.N., Silva, E.V.C. (2011). Criopreservação de sêmen bovino. UNOPAR Científica, Ciências Biológicas e da Saúde, v.13, s.4, p.279-286.

Leverone Calvi, S., Maise, G. (1998). Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blastomeres: influence of embryo stage on postthaw survival rate. Cryobiology, v.36, p.255-262.

Li, J., Zhang, L.L., Liu, Q.H., Xu, X.Z., Xiao, Z.Z., Ma, D.Y., Xu, S.H., Xue, Q.Z. (2009). Extra-cand intra-cellular ice formation of red seabream (*Pagrus major*) embryos at different cooling rates. Cryobiology, v.59, p.48-53.

Liu, X.H., Zhang, T., Rawson, D.M. (2001). Effect of cooling rate and partial removal of yolk on the chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Theriogenology, v.55, p.1719-1731.

Lopera-Barrero, N.M., Ribeiro, R.P., Povh, J.A., Mendez, L.D.V., Poveda-Parra, A.R. (2011). Produção de organismos aquáticos: uma visão no Brasil e no mundo. Guaíba, RS: Agrolivros, 320p.

Lopes, T.S., Romagosa, E., Streit Junior, D.P., Ribeiro, R.P., Digmayer, M. (2011). Cooling of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos at various stages of development for 6 or 10 hours. Theriogenology, v.75, p.570-576.

Martino, A., Pollard, J.A., Leibo, S.P. (1996) Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. Molecular Reproduction Development, v.45, p.503-512.

Mazur, P. (1963) Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *Journal of General Physiology*, v.47, p.347-369.

Mazur, P. (1984) Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*, v.247, p.125-142.

Ministério da Pesca e Aquicultura – MPA. Boletim Estatístico da pesca e Aquicultura: Brasil 2011. Brasília, 2013.

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

Pegg D. E. (2007). Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols Methods in: *Molecular Biology*, 2.ed. Totowa:Humana Press Inc. 348p.

Rall, W.F. (1992) Cryopreservation of oocytes and embryos: Methods and applications. *Animal Reproduction Science*, v.28, p.237-245.

Rana, K. (1995). Preservation of gametes. In: Broodstock management and egg and larval quality. Bromage, N., Roberts, R., Editors. Ed: Blackwell Science. p. 53-75.

Resende, E.K., Oliveira, C.A.L., Legat, A.P., Ribeiro, R.P. (2010). Melhoramento animal no Brasil: uma visão crítica espécies aquáticas. In: VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal. Anais... Maringá. 11p.

Ribeiro, C.R., Santos, H.S.L., Bolzan, A.A. (1995). 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.

Riehl, R. (1993). Surface morphology and micropyle as a tool for identifying fish eggs by scanning electron microscopy. *Microscopy and analysis*, p.29-31.

Robles, V., Cabrita, E., Herráez, M.P. (2009). Germplasm cryobanking in zebrafish and other aquarium model species. v.6, n. 3, 281-293.

Robles, V., Cabrita, E., Paz, P., Cuñado, S., Anel, L. Herráez, M.P. (2004). Effect of a vitrification protocol on the lactate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities and the hatching rates of zebrafish (*Danio rerio*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos. *Theriogenology*, v.61, p.1367-1379.

Silva, S.V., Guerra, M.M.P. (2011). Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.35, n.4, p.370-384.

Streit Junior, D.P., Digmayer, M., Ribeiro, R.P., Sirol, R.N., Moraes, G.V., Galo, J.M. (2007). Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, n.8, p.1199-1202.

Streit Junior, D.P., Oliveira, A.C., Ribeiro, R.P., Sirol, R.N., Moraes, G.V., Galo, J.M., Digmayer, M. (2009). Motilidade, vigor e patologias seminais in natura e pós criopreservação de *Piaractus mesopotamicus*. *Boletim Instituto de Pesca*, v.35, n.2, p.159-167.

Suárez, H., Pardo, S., Cortes, M. (2008). Análisis estructural de filetes sajudos de híbrido de cachama *Piaractus braquypomus* x *Colossoma macropomum* utilizando bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* lpbm10 empacado al vacío. *Revista Mvz Córdoba*, v.13, p.1315-1325.

Tsai, S., Lin, C. (2012). Advantages and applications of cryopreservation in fisheries science. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.55, n.3, p.425-433.

Tsai, S., Rawson, D.M., Zhang, T. (2009). Studies on chilling sensitivity of early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. *Cryobiology*, v.58, p.279-286.

Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P.J., Jacobsen, H., Greve, T., Callesen, H. (1998) 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.

Valdez D.M., Miyamoto A., Hara T., Edashige K., Kasai M. (2005). Sensitivity to chilling of medaka (*Oryzias latipes*) embryos at various developmental stages. *Theriogenology*, v.64, p.112–122.

Vásquez-Torres, W. (2005). A Pirapitinga, reprodução e cultivo. In: *Espécies nativas para piscicultura no Brasil: Baldisserotto, B., Gomes, L.C. Santa Maria: ED. da UFSM. Pp.470.*

Ventueri, R., Bernardino, G. (1999). Hormônios na reprodução artificial de peixes. *Panorama da Aquicultura*, Rio de Janeiro, v.55, s.9, p.39-49.

Wanderley, L.S., Luz, H.K.M., Faustino, L.R., Lima, I.M.T., Lopes, C.A.P., Silva, A.R., Bão, S.N., Campello, C.C., Rodrigues, A.P.R., Figueiredo, J.R. (2012). Ultrastructural features of agouti (*Dasyprocta aguti*) preantral follicles cryopreserved using dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propanediol. *Theriogenology*, v.77, p.260-267.

Whittingham, D.G. (1977). Some factors affecting embryo storage in laboratory animals. *Ciba Found Symp*, v.52, p.97-127.

Wu, C., Rui, R., Dai, J., Zhang, C., Ju, S., Xie, B., Lu, X., Zheng, X. (2006). Effects of cryopreservation on the developmental competence, ultrastructure and cytoskeletal structure of porcine oocytes. *Molecular reproduction and development*, v.73, p.1454-1462.

Zelazowska, M. (2010). Formation and structure of egg envelopes in Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii* (Acipenseriformes: Acipenseridae). *Journal of Fish Biology*, v.76, p.694-706.

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

Zhang T., Liu X.H., Rawson D.M. (2003). Effects of methanol and developmental arrest on chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology*, v.59, p.1545–1556.

Zhang, T., Rawson, D.M., (2007). Cryo-conservation in fish: the potentials and challenges. *Abstracts/ Cryobiology*, v.55, p.354.

## OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a viabilidade de criopreservação de oócitos de *Colossoma macropomum* após exposição a soluções crioprotetoras, mantidos em temperatura ambiente e após congelação lenta (nitrogênio líquido).

Avaliar a viabilidade de criopreservação de oócitos de *Piaractus brachypomus* após exposição a soluções crioprotetoras, mantidos em temperatura ambiente e após a congelação lenta (nitrogênio líquido).

Avaliar a viabilidade de criopreservação de embriões de *P. brachypomus* após exposição a diferentes soluções crioprotetoras, e submetidos ao resfriamento de -13°C por oito horas e congelação lenta (nitrogênio líquido).

## CAPÍTULO II

## Soluções crioprotetoras para oócitos de *Colossoma macropomum*

### *Cryoprotectant solutions for oocytes of Colossoma macropomum*

**Resumo:** Foi avaliada a viabilidade dos oócitos de *Colossoma macropomum* expostos ao metanol, associado a duas concentrações de crioprotetor externo, em temperatura ambiente e congelamento lento. Os oócitos foram distribuídos em sete tratamentos e mantidos em soluções crioprotetoras por 20 minutos, em temperatura ambiente, fertilizados e levados às incubadoras. Uma segunda parcela dos oócitos foi submetida a congelamento lento, mantido em nitrogênio líquido, descongelado, sendo parte fixada e outra parte fertilizada e levada às incubadoras. A probabilidade de ocorrer sobrevivência dos oócitos submetidos ao T1 em temperatura ambiente foi maior (15,8%). Quanto à sobrevivência depois de eclodidas as larvas, não houve diferença entre os tratamentos. Na fertilização dos oócitos que passaram pela congelamento lento não foi obtida eclosão das larvas. Foi verificada preservação morfológica nos T1 e T2 cuja solução crioprotetora continha metanol 1,6M e sacarose 0,25 e 0,50M, respectivamente. A solução crioprotetora contendo metanol 1,6M associado com 0,25M sacarose foi a de menor toxicidade para os oócitos de *C. macropomum*.

**Palavras-chave:** Crioinjúrias, criopreservação, metanol, gameta feminino.

**Abstract:** The aim of this study was to evaluate the viability of oocytes of *C. macropomum* exposed to methanol, associated with two different cryoprotectants external concentrations, at room temperature and slow freezing. Oocytes were divided into seven treatments and kept in cryoprotectant solutions for 20 minutes at room temperature, fertilized and taken to incubators. A second portion of the oocytes were underwent to slow freezing, stored in liquid nitrogen, thawed, and a part was fixed while the other was fertilized and kept in incubators. The survival probability of oocytes subjected to treatment 1 (1.6 M methanol and 0.25 M sucrose) at room temperature was higher (15.8%). As for survival after hatched larvae, there was no difference between treatments. In the fertilization of oocytes that passed by slow freezing there was not hatching. Morphological preservation was observed in treatments 1 and 2 with a cryoprotectant solution containing methanol 1.6 M and sucrose 0.25 and 0.50 M, respectively. In conclusion, the methanol solution containing 1.6 M cryoprotectant associated with 0.25M sucrose was the least toxicity to the oocyte of *C. macropomum*.

**Key words:** Chilling injury, cryopreservation, methanol, female gamete.

### *Introdução*

Nos últimos anos, a criopreservação é considerada uma ferramenta importante na viabilização de programas de melhoramento genético de peixes, devido o aumento do interesse nestes programas (Tiersch, 2008). Através da utilização de criobancos de genes vivos, uma boa parte da representação genética dos reprodutores pode ser estocada para ser utilizada posteriormente (Rana, 1995).

Muito embora ainda não ocorra sucesso na criopreservação de oócitos e embriões de peixes, a atual necessidade de preservação genética de gametas maternos tem incentivado a busca por protocolos de criopreservação efetivos (Zhang & Rawson, 2007; Robles et al., 2009). A opção na criopreservação de oócitos de peixes tem como vantagem, seleção do sêmen no momento da descongelação, em que a escolha do contribuinte paterno ocorre após a conservação (Zhang & Rawson, 2007), além da liberdade de se produzir alevinos no período de interesse, pelo sucesso dos protocolos de congelamento de sêmen.

Para reduzir os danos tóxicos e osmóticos ocorridos durante o processo de congelamento e descongelamento, preconiza-se o uso de crioprotetores menos tóxicos e da combinação entre eles (Green, 2005). Os crioprotetores são classificados em dois tipos, baseado na sua habilidade de permear as membranas celulares. Crioprotetores internos ou penetrantes são compostos de baixo peso molecular, que permeiam as células mais facilmente retirando a água, e capacitando a célula para suportar a redução na temperatura, ex. metanol, dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, entre outros. Os crioprotetores externos ou não penetrantes são moléculas de alto peso molecular como a sacarose, frutose, trealose e geralmente não penetram a membrana durante um curto intervalo de exposição sendo responsáveis por reduzir a formação de gelo, facilitando a desidratação e protegendo a membrana celular (Niemann, 1991; Denniston et al., 2000).

Pelo seu menor tamanho, menor sensibilidade a baixas temperaturas e a toxicidade das soluções crioprotetoras, além de apresentar maior permeabilidade de membrana, os oócitos de peixes possuem algumas vantagens em relação a outras espécies, especialmente nas fases iniciais de desenvolvimento. Mas, é preciso submetê-los à

ovulação *in vitro*, maturação e fertilização após a criopreservação, tornando o protocolo minucioso (Zhang & Rawson, 2007).

Não se tem relato de nenhum trabalho com oócitos de *C. macropomum*, apenas um estudo indicou que a solução crioprotetora que proporcionou maior taxa de sobrevivência aos embriões de *C. macropomum* após resfriamento e incubação foi a solução com 10% de metanol e 17% de sacarose (Fornari, 2012).

O tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), ocorre naturalmente nas bacias do rio Amazonas e rio Orinoco, e vive em águas ricas em nutrientes com temperatura entre 25 e 34°C (Araújo-Lima e Gomes, 2005). Com um grande potencial para a aquicultura, a espécie se destaca dentre os grupos de peixes nativos cultivados no Brasil, pela sua textura e sabor da carne, sendo a principal espécie de peixe cultivada na região Norte (Cartonilho e Jesus, 2011). A partir de suas qualidades zootécnicas, a espécie foi escolhida para iniciar um programa de melhoramento genético no Brasil (Resende et al., 2010). Todavia, apesar de todas as virtudes zootécnicas da principal espécie nativa produzida no Brasil, o *C. macropomum* possui uma limitação relacionada a sua estratégia reprodutiva. Por se tratar de uma espécie reofílica e seu período reprodutivo ocorrer na época das chuvas, entre outubro e março (Ventueri e Bernardino, 1999), este fator limita a oferta anual de alevinos, sendo necessário o desenvolvimento de biotecnologias que permitam solucionar essa demanda.

O objetivo do estudo foi avaliar a viabilidade dos oócitos de *C. macropomum* expostos ao metanol, associado com diferentes crioprotetores externos, em temperatura ambiente e após congelação lenta.

## *Material e Métodos*

### *Origem dos oócitos utilizados no estudo*

Duas fêmeas, com peso médio de  $6,45 \pm 1,15$ kg, de *C. macropomum* foram induzidas com extrato de hipófise e oitocentos e dez oócitos (405 de cada animal) foram selecionados após a extrusão, homogeneizados e em seguida colocados em solução de Hank (Cultilab®) (Isayeva et al., 2004) para manutenção da viabilidade *in vitro*.

### *Experimento 1. Avaliação dos oócitos nas soluções crioprotetoras*

Os oócitos foram distribuídos em sete tratamentos (Tab. 1) considerando a composição das soluções crioprotetoras (seis) e um controle (oócitos para controle de

eclosão). Em cada um dos tratamentos foram utilizados 90 oócitos, sendo distribuídos em três repetições com 30 oócitos, totalizando nesta etapa 630 oócitos. As soluções crioprotetoras foram elaboradas com base em trabalhos realizados por Streit Junior et al. 2007 e Digmayer (2010).

Tabela 1. Molaridade dos crioprotetores interno (metanol) e externos (sacarose, trealose e frutose) das soluções crioprotetoras para oócitos de *C. macropomum*.

Soluções crioprotetoras	Metanol	Sacarose	Trealose	Frutose
1	1,6	0,25	-	-
2	1,6	0,5	-	-
3	1,6	-	0,25	-
4	1,6	-	0,5	-
5	1,6	-	-	0,25
6	1,6	-	-	0,5
Controle de eclosão	-	-	-	-

Os oócitos foram mantidos em soluções crioprotetoras no tempo proposto de 20 minutos, em temperatura ambiente (30°C). Após esse período, fertilizou-se os oócitos de cada tratamento com 30 µl de sêmen fresco, apresentando parâmetros de 100:5 de motilidade progressiva e vigor espermático, respectivamente, obtido a partir de um único macho evitando efeito do indivíduo. Os ovos foram mantidos em incubadoras experimentais e permaneceram por 12 horas, até o momento da eclosão das larvas. A validação dos resultados nesta etapa foram as quantificações dos embriões mortos (não se desenvolveram), embriões desenvolvidos (identificados a partir do estágio de cauda solta) e larvas vivas (que eclodiram efetivamente).

#### *Experimento 2. Avaliação dos oócitos submetidos à congelação lenta*

Após os 20 minutos dos oócitos terem sido submetidos nas seis soluções crioprotetoras relacionadas no *Experimento 1*, estes foram envasados em palhetas de 0,5 ml e levados ao congelador programável Dominion K (Biocom®), para avaliação da efetividade das soluções sob baixas temperaturas. A temperatura de -7°C foi realizado o *seeding* e a curva de congelação utilizada foi de 1,0°C/minuto. Ao final da congelação as palhetas foram transferidas para o botijão de nitrogênio líquido (-196°C). Decorrido o tempo proposto de criopreservação de um mês, descongelou-se os oócitos (de todos tratamentos) em banho-maria de 30°C por aproximadamente 15 segundos, e fertilizou-

se com sêmen congelado, com parâmetros de 25:2 de motilidade progressiva e vigor espermático, respectivamente, pois não havia disponibilidade de sêmen fresco. Em seguida os ovos foram mantidos em incubadoras experimentais para verificar possível desenvolvimento embrionário.

#### *Análise morfológica*

Para verificação dos danos provocados nos oócitos, no momento da descongelação, fixou-se o material em solução de glutaraldeído 2,5%, utilizando o tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2, para análise morfológica (Perini et al., 2013) dos tratamentos em que foi obtida a melhor resposta de sensibilidade dos embriões as soluções crioprotetoras em temperatura ambiente (*Experimento 1*).

Para o processamento histológico, os oócitos de cada amostra foram transferidos para álcool 70%. Posteriormente foram desidratados em álcool 80, 90, 95, 100% e em seguida com solução de infiltração (resina com ativador) na proporção de 1:1, estocados *overnight* a 4°C, em solução de infiltração. Após este período o material foi incluso em formas específicas com solução para inclusão (solução de infiltração com endurecedor) e os blocos obtidos permaneceram em estufa a 37°C/10 dias para secagem. Os blocos foram então, submetidos à microtomia para obtenção de cortes seriados de 2 µm de espessura (micrótomo Leica RM2245®), colocados sobre lâminas de vidro, e corados pelo método de hematoxilina-floxina (Tolosa et al., 2003). As imagens foram capturadas em microscópio de luz (Olympus BX 41®) acoplado com câmara de alta resolução, através do programa Q Capture Pro 51.

Para o processamento em microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras foram lavadas e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%/4 horas, novamente lavadas em tampão e submetidas à desidratação em série crescente de etanol. A secagem do material foi obtida ao ponto crítico com líquido CO<sub>2</sub> e as peças montadas em suporte para, em seguida, serem metalizadas com ouro-paládio. Os oócitos foram examinados e eletromicrografados em Microscópio Eletrônico de Varredura JSM – 5410 (JEOL®).

#### *Análise estatística*

Avaliou-se a existência de diferenças estatísticas entre os tratamentos, por meio da metodologia de modelos lineares generalizados. Para tanto, estimou-se as probabilidades de embriões mortos e desenvolvidos e larvas vivas após a eclosão para cada tratamento e se comparou estas, por meio do teste de qui-quadrado implementado

no Proc GENMOD do SAS. No processo de estimação, utilizou-se a função ligação logit considerando que os resíduos que apresentaram distribuição binomial. Foram testados os contrastes entre sacarose *versus* trealose (C1), sacarose *versus* frutose (C2) e trealose *versus* frutose (C3).

## Resultados

### Experimento 1. Avaliação dos oócitos nas soluções crioprotetoras

Na figura 1, está representado o aspecto morfológico dos embriões mortos (A), desenvolvidos (B) e larvas vivas (que eclodiram) (C), obtidos a partir do experimento de avaliação da sensibilidade às soluções crioprotetoras.

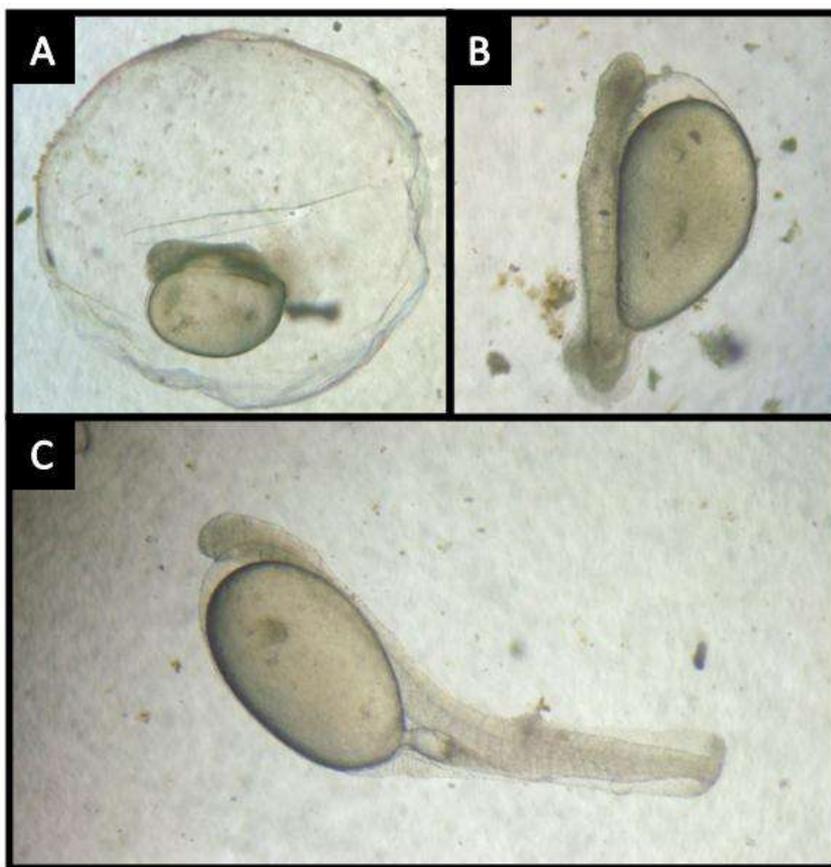


Figura 1. Embrião morto (A), desenvolvido (B) e larva viva (C) de *C. macropomum*, após a avaliação da sensibilidade em temperatura ambiente. Imagem obtida em estereomicroscópio com aumento de 20X.

Analisando as larvas que estavam vivas após a eclosão, em todos os tratamentos houve diferença ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle. A probabilidade de ocorrer sobrevivência dos oócitos submetidos ao tratamento 1 (metanol 1,6M e sacarose 0,25M)

em temperatura ambiente foi maior (15,8%). Por outro lado, quando se testou o tratamento 6 (metanol 1,6M + frutose 0,5M), a resposta foi de apenas 4% de viabilidade dos embriões. Quanto à sobrevivência depois de eclodidas as larvas, não houve diferença entre os tratamentos (Tab. 2).

Tabela 2. Percentual de embriões mortos, desenvolvidos e larvas vivas após a eclosão de embriões provenientes dos diferentes tratamentos de sensibilidade dos oócitos de *C. macropomum* a soluções crioprotetoras em temperatura ambiente (30°C).

Tratamentos	Embriões (%)		Larvas vivas após a eclosão, proveniente dos embriões desenvolvidos (%)
	Mortos	Desenvolvidos	
1	84,2 <sup>c</sup>	15,8 <sup>b</sup>	66,7 <sup>b</sup>
2	89,8 <sup>bcd</sup>	10,2 <sup>bcd</sup>	66,7 <sup>b</sup>
3	87,9 <sup>cd</sup>	12,1 <sup>bc</sup>	53,9 <sup>b</sup>
4	93,4 <sup>bc</sup>	6,6 <sup>cd</sup>	57,1 <sup>b</sup>
5	93,5 <sup>bc</sup>	6,5 <sup>cd</sup>	74,9 <sup>b</sup>
6	96,0 <sup>a</sup>	4,0 <sup>d</sup>	74,9 <sup>b</sup>
7	4,0 <sup>d</sup>	96,0 <sup>a</sup>	97,9 <sup>a</sup>

\* colunas com diferentes letras sobrescritas apresentam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

Os contrastes testados (Tab. 3) entre os diferentes crioprotetores extracelulares houve diferença ( $P < 0,05$ ) entre os açúcares, sacarose *versus* frutose, em que os embriões desenvolvidos em sacarose foi melhor que a frutose. Quanto ao contraste sacarose *versus* trealose, e trealose *versus* frutose não ocorreu diferença ( $P > 0,05$ ) para embriões desenvolvidos. Nenhum dos contrastes para a porcentagem de larvas vivas após a eclosão ocorreu diferença ( $P > 0,05$ ) entre os crioprotetores externos.

Tabela 3. Contrastes testados entre sacarose vs trealose (C1), sacarose vs frutose (C2) e trealose vs frutose (C3) nos diferentes tratamentos de sensibilidade dos oócitos de *C. macropomum* às soluções crioprotetoras em temperatura ambiente (30°C).

Contrastes testados	Embriões desenvolvidos (%)	Larvas vivas após a eclosão (%)
C 1	0,2234 <sup>ns</sup>	1,4509 <sup>ns</sup>
C 2	0,0054*	0,6139 <sup>ns</sup>
C 3	0,1207 <sup>ns</sup>	0,2881 <sup>ns</sup>

\*os contrastes diferenciam entre si a  $P < 0,05$ . <sup>ns</sup> não significativo.

### Experimento 2. Avaliação dos oócitos submetidos a congelação lenta

Na fertilização dos oócitos que passaram pelo processo de congelação lenta não foi obtida eclosão das larvas. Em todos os tratamentos, aproximadamente uma hora depois

dos oócitos descongelados terem sido fertilizados e depositados nas incubadoras, verificou-se que todo material biológico resultante não suportou o processo de hidratação e se desfizeram.

Dentre os tratamentos avaliados, constatou-se a preservação morfológica nos tratamentos 1 e 2 cuja solução crioprotetora continha metanol (1,6M) e sacarose 0,25 e 0,50M, respectivamente. No grupo três (metanol 1,6M e trealose 0,25M) foi observada irregularidade na distribuição dos grânulos de vitelo, ficando condensados em um lado do oócito.

Na morfologia dos oócitos de *C. macropomum* submetidos à congelação lenta com solução crioprotetora de metanol 1,6M e sacarose 0,25M, foi possível observar alguns detalhes que caracterizam os processos relacionados à baixa temperatura. Os oócitos apresentaram regularidade na forma (Fig. 2A), sendo preenchido com grânulos de vitelo heterogêneos no tamanho, e característica tintoral indicando diferentes fases de maturação (Fig. 2B). Envolvendo os oócitos, encontrava-se a região denominada de zona radiata íntegra (sem interrupções) apesar de visível descolamento da mesma (Fig. 2C).

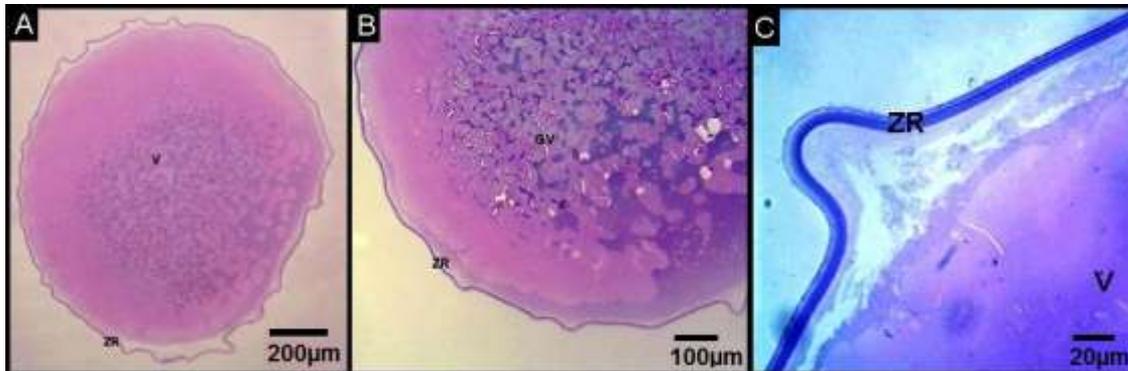


Figura 2. Fotomicrografia de oócitos de *C. macropomum* criopreservados com solução de metanol 1,6M e sacarose 0,25M, evidenciando vitelo (V) e zona radiata (ZR). Hematoxilina-Floxina.

As características que indicaram preservação para estes tratamentos também foram constatadas em MEV, não sendo observadas alterações morfológicas na região micropilar e sendo mantida a integridade da zona radiata com superfície lisa e regular (Fig. 3A). Externamente foi possível distinguir a zona radiata com inúmeros poros, sendo também visível estriações perpendiculares na face interna da estrutura (fig. 3B).

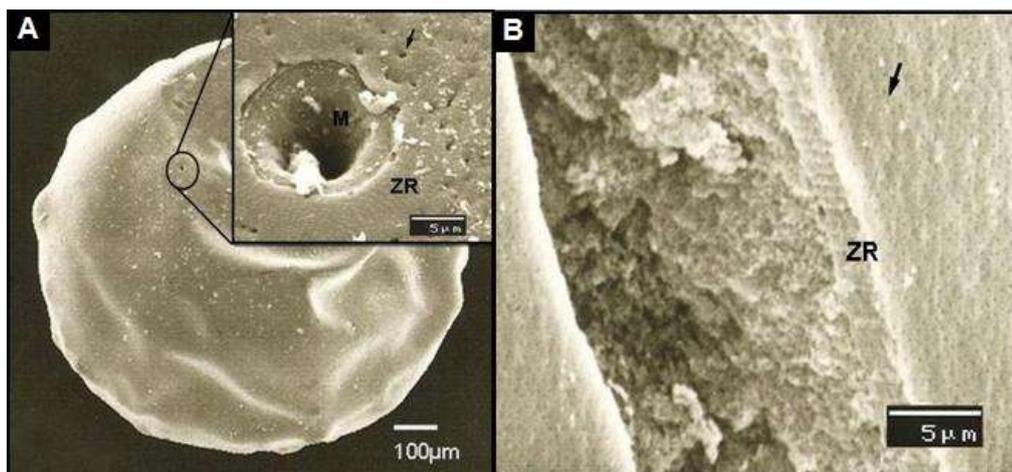


Figura 3. Eletromicrografia de oócitos de *C. macropomum* criopreservados com solução de metanol 1,6M e sacarose 0,25M evidenciando micrópila (M), zona radiata (ZR) e poros (seta).

### Discussão

Oócitos de *C. macropomum* mantidos em soluções crioprotetoras contendo baixa osmolaridade de açúcares, como crioprotetores externos, resultaram em maior sobrevivência com relação aos oócitos mantidos nas soluções com maiores molaridades, em temperatura ambiente. Dentre as soluções testadas, foi constatada maior sobrevivência (15,8%) no T1, utilizando metanol 1,6M e sacarose 0,25M. Essa combinação de metanol e sacarose também foi constatada como a melhor solução para o resfriamento de embriões de *Piaractus mesopotamicus* em estágio de 90% de epibolia de desenvolvimento embrionário (Streit Junior et al., 2007). As análises de contrastes entre os crioprotetores externos indicam que a sacarose proporcionou mais porcentagem de embriões desenvolvidos, sugerindo ser o melhor açúcar nas soluções crioprotetoras para oócitos de *C. macropomum*.

A toxidez do crioprotetor sempre é relacionada como um fator determinante da criopreservação. No presente trabalho, embora após a congelação oocitária não tenha ocorrido eclosão das larvas, ao submeter os oócitos ao metanol 1,6M associado a sacarose 0,25M, em temperatura ambiente, houve fertilização dos oócitos, desenvolvimento embrionário e até a eclosão das larvas. Com esta observação é possível afirmar que parte dos oócitos manteve viável e com capacidade fecundante, indicando que nessas concentrações, tanto o metanol quanto a sacarose não foram totalmente tóxicos aos oócitos.

Com relação à incapacidade de fertilização dos oócitos congelados, Isayeva et al. (2004) indicaram que a sensibilidade dos oócitos de *Danio rerio* ao resfriamento pode ser um dos fatores limitantes do sucesso de um protocolo de criopreservação, bem como a baixa permeabilidade da membrana (Zhang et al., 2005).

A exposição a temperaturas críticas (abaixo de 0°C) é determinante para a sobrevivência de oócitos de peixes. Como observou Isayeva et al. (2004) após 15 minutos a 0°C, a metade dos oócitos de *Danio rerio* estavam viáveis. No presente estudo de congelação lenta, a temperatura de *seeding* ocorreu a -7°C e esse pode ter sido determinante para viabilidade oocitária do *C. macropomum*. Entretanto, a constatação positiva de desenvolvimento de um protocolo de congelação lenta para oócitos de *C. macropomum*, foi a manutenção da estrutura física oocitária. De fato, ocorreu logo após a descongelação, porém foi verificado através da fertilização que os mesmos estavam com a sua capacidade fecundante prejudicada, mesmo mantendo a sua estrutura morfológica, como foi possível constatar inclusive a manutenção da micrópila observada na figura 3A. Por outro lado, a estrutura interna do oócito estava comprometida, com os rearranjos estruturais do oócito danificados e deste modo não ocorreu a fusão de gametas e subseqüentes divisões embrionárias.

A avaliação dos danos causados pela criopreservação é de grande relevância, pois pode ser utilizada para a caracterização da intensidade das lesões celulares causadas pelas injúrias, que podem incapacitar as células de superarem os danos e perderem sua viabilidade (Carvalho et al., 2012).

Conforme Santos et al. (2006), no método de congelação lenta as células são expostas a baixas concentrações de crioprotetores por até uma hora e submetidas ao congelador programável estabilizado a temperatura de -5°C, seguido de cristalização manual, com objeto metálico, congelado em nitrogênio líquido, e de resfriamento lento (0,5°C/min) até -32°C. Lopes et al. (2012) estudando resfriamento de embriões de *P. mesopotamicus* a -8°C por seis horas, verificaram que a curva de resfriamento de 1°C/minuto proporcionou maior porcentagem (90,85%) de larvas vivas. No presente trabalho, o processo de congelação lenta, com curva de 1°C/minuto, prejudicou a capacidade fecundante dos oócitos, pois não foi obtida fertilização e desenvolvimento embrionário.

Verificou-se também que no tratamento em que se utilizou solução de metanol 1,6M e sacarose 0,25M, a membrana da zona radiata estava descolada. Esta observação corrobora com a de Zhang et al. (2005) que encontraram as membranas da zona radiata

e oolema separadas em oócitos em estágio “V” de *zebrafish* durante a exposição a 2M de DMSO ou propilenoglicol a temperatura de 22°C. Ainda de acordo com Zhang et al. (2005) esta separação pode ser pela reação de ativação, que é induzida pela mudança de temperatura, estimulação física e exposição à solução com diferente pressão osmótica. Sugeriram também que a permeabilidade da zona radiata é maior que do oolema, formando um acúmulo de crioprotetores no espaço perivitelino, separando as membranas. O procedimento de criopreservação pode causar a fragmentação do DNA, mesmo na ausência de deformidades celulares (Carvalho et al., 2012), bem como alterações cromossômicas (Burgoyne et al., 1991), despolimerização dos microtúbulos e microfilamentos, causando a destruição dos componentes do citoesqueleto (Dobrinsky, 2002) inviabilizando os oócitos.

Conclui-se que a solução crioprotetora contendo metanol 1,6M associado com 0,25M sacarose foi a menos tóxica para os oócitos de *C. macropomum*. Apesar dos oócitos de *C. macropomum* serem extremamente sensíveis à temperatura de criopreservação, mantiveram algumas estruturas morfológicas, como a micrópila, aparentemente normais. Para se desenvolver um protocolo de criopreservação de oócitos de peixes são necessários mais estudos com diferentes tempos de exposição, diferentes concentrações de crioprotetores internos e externos, sendo recomendado o metanol como crioprotetor interno e sacarose como crioprotetor externo, por demonstrarem menor toxicidade aos oócitos de *C. macropomum*.

### Referências

Araújo-Lima, C.A.R.M., Gomes, L.C. (2005). Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Baldisserotto, B., Gomes, L.C. Editores. Santa Maria: Ed. Da UFSM, 470p.

Burgoyne P.S., Holland K. & Stephens R. (1991). Incidence of numerical chromosome anomalies in human pregnancy estimation from induced and spontaneous abortion data. Human Reproduction, v.6, n.4, p.555-565.

Cartonilho, M.M., Jesus, R.S. (2011). Qualidade de cortes congelados de tambaqui cultivado. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.46, n.4, p.344-350.

Carvalho, A.A., Faustino, L.R., Castro, S.V., Figueiredo, J.R., Rodrigues, A.P.R. (2012). Caracterização dos danos celulares em gametas femininos e embriões após criopreservação. Acta Scientiae Veterinariae, v.40, n.3, p.1046.

Denniston, R.S., Michelet, S., Godke, R.A. (2000). Principles of cryopreservation. In: Cryopreservation in aquatic species. Tiersch, T.R., Mazik, P.M., Editors. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. Pp.59-74.

Digmayer, M. (2010). Viabilidade de embriões de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), submetidos a -8°C e, diferentes concentrações de crioprotetores.

Maringá. 46p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá.

Dobrinsky J.R. (2002). Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*, v.57, n.1, p.285-302.

Fornari, D.C. (2012). Crioconservação de embriões de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Maringá. 77p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá.

Green, R.E. (2005). Princípios e técnicas da vitrificação de embriões dos animais domésticos. Botucatu. 21p. Monografia - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

Isayeva, A., Zhang, T., Rawson, D.M. (2004). Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. *Cryobiology*, v.49 p.114-122.

Lopes, T.S., Streit Junior, D.P., Fornari, D.C., Oliveira, D., Ribeiro, R.P., Romagosa, E. (2012). Chilling curves for *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) embryos stored at -8°C. *Zygote*, Março 8, p.1-6. <http://dx.doi.org/10.1017/S0967199412000020>.

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

Perini, V.R., Sat, Y., Rizzo, E., Bazzoli, N. (2013). Comparative Analysis of the Oocytes and Early Development of Two Species of Curimatidae Teleost Fish. *Anat. Histol. Embryol.*, v.42, p.40–47.

Rana, K. Preservation of gametes. (1995) In: Bromage, N.R., Roberts, R.J. Editors. Broodstock management and egg and larval quality. London: Blackwell Science. p.53-75.

Resende, E.K., Oliveira, C.A.L., Legat, A.P., Ribeiro, R.P. (2010). Melhoramento animal no Brasil: uma visão crítica espécies aquáticas. In: VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal. *Anais...* Maringá. 11p.

Robles, V., Cabrita, E., Herráez, M.P. (2009). Germplasm cryobanking in zebrafish and other aquarium model species. *Fish Haus*, v.6, n3, p.281-293.

Santos, R.R., Rodrigues, A.P.R., Amorim, C.A., Costa, S.H.F., Matos, M.H.T., Silva, J.R.V., Celestino, J.J.H., Martins, F.S., Saraiva, M.V.A., Melo, M.A.P., Figueiredo, J.R. (2006). Teste de toxicidade e criopreservação de folículos pré-antrais ovinos isolados utilizando Glicerol, Etilenoglicol, Dimetilsulfóxido e Propanodiol. *Brazilian Journal of Veterinary Research*, v.43, p.250-255.

Streit Junior, D.P., Digmayer, M., Ribeiro, R.P., Sirol, R.N., Moraes, G.V., Galo, J.M. (2007). Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.42, n.8, 1199-1202.

Tiersch, T.R. (2008) Strategies form commercialization of cryopreservation fish semen. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37, suplemento especial, p.15-19.

Tolosa, E.M.G., Behmer, O.A., Freitas Neto, A.G. (2003). Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: Edart, Edusp, 240p.

Ventueri, R., Bernardino, G. (1999). Hormônios na reprodução artificial de peixes. *Panorama da Aqüicultura*, Rio de Janeiro, v.55, n.9, p.39-49.

Zhang, T., Isayeva, A., Adams, S.L., Rawson, D.M. (2005). Studies on membrane permeability of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes in the presence of different cryoprotectants. *Cryobiology*, v.50, p.285–293.

Zhang, T., Rawson, D.M. (2007). Cryo-conservation in fish: the potentials and challenges. *Abstracts/ Cryobiology*, v.55, p.354.

## CAPÍTULO III

## Criopreservação de oócitos e embriões de *Piaractus brachypomus* *Cryoprotectant solutions for oocytes and embryos of Piaractus brachypomus*

**Resumo:** Foi avaliada a sensibilidade dos oócitos de *P. brachypomus* expostos a diferentes soluções crioprotetoras em temperatura ambiente e criopreservado, e embriões submetidos a diferentes concentrações de crioprotetores internos (metanol ou DMSO) e externos (sacarose ou polivinilpirrolidona), a congelação em -13°C e em nitrogênio líquido. Os oócitos foram distribuídos em oito tratamentos contendo diferentes concentrações de metanol ou dimetilsulfóxido, associado com sacarose. Os embriões congelados a -13°C foram distribuídos em oito tratamentos com diferentes concentrações de metanol, sacarose e polivinilpirrolidona. Os embriões congelados em nitrogênio líquido foram distribuídos em quatro diferentes soluções contendo metanol 3,1M, associado a quatro concentrações de sacarose (0,45; 0,63; 0,81 e 1,0). Para análise morfológica, foram processados oócitos e embriões em historesina e oócitos para técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Dos oócitos que foram mantidos em temperatura ambiente e fertilizados, os tratamentos que apresentaram desenvolvimento embrionário foram o T5 (metanol 1,5M, sacarose 0,25 M e solução de Hank), 17,3% e T7 (DMSO 0,7M, sacarose 0,25 M e solução de Hank), 1,8%. Na fertilização dos oócitos submetidos à curva de congelação lenta não houve desenvolvimento embrionário após a fertilização. Na avaliação morfológica, verificou-se que os oócitos de *P. brachypomus* submetidos a congelação lenta quando na solução crioprotetora com 1,6M metanol+ 0,25M sacarose + solução de Hank (T5) apresentaram a zona radiata íntegra e com contorno regular. Dos embriões que foram submetidos à congelação a -13°C, no T5, 15,3% dos embriões se desenvolveram e foi significativamente maior que no T6 (4,6%), T3 (1,5%), T7 (1,8%) e T8 (1,9%) e também houve desenvolvimento embrionário. Nos demais tratamentos, todos os embriões submetidos às soluções crioprotetoras em temperatura de -13°C e os embriões submetidos aos tratamentos em nitrogênio líquido resultaram em embriões mortos. Conclui-se que os oócitos de *P. brachypomus* não resistiram à curva de congelamento, e a solução com metanol 3,1M associado à sacarose 0,45M foi quem melhor preservou as estruturas dos embriões resfriados a -13°C.

**Palavras-chave:** crioprotetor, congelação, embriões, oócitos.

*Abstract:* The sensitivity of oocytes of *P. brachypomus* exposed to different cryoprotectant solutions at room temperature and cryopreserved, embryos subjected to different concentrations of internal (methanol or DMSO) and external cryoprotectants (sucrose or polyvinylpyrrolidone), frozen in  $-13^{\circ}\text{C}$  and in liquid nitrogen were evaluated. The oocytes were allocated into eight treatments containing different concentrations of methanol or dimethyl sulfoxide, associated with sucrose. The embryos frozen at  $-13^{\circ}\text{C}$  were allocated into eight treatments with different concentrations of methanol, sucrose, and polyvinylpyrrolidone. The embryos frozen in liquid nitrogen were allocated into four different solutions containing 3.1 M of ethanol, combined with four concentrations of sucrose (0.45, 0.63, 0.81 and 1.0). For morphological analysis oocytes and embryos were processed in historesin and oocytes for scanning electron microscopy technique. For oocytes kept at room temperature and fertilized, treatments that showed embryo development were T5 (methanol 1.5 M, sucrose 0.25 M solution and Hank), 17.3% and T7 (DMSO 0.7 M, sucrose 0.25 M and Hank) 1.8%. In fertilization of oocytes subjected to slow freezing curve there was not embryo development after fertilization. In the morphological analysis it was found that the oocytes of *P. brachypomus* when subjected to slow freezing in extender solution with methanol 1.6 M + sucrose 0.25 M + solution Hank (T5) showed a full zona radiata full with regular contour. From embryos that were underwent freezing at  $-13^{\circ}\text{C}$  in T5, 15.3% developed and was significantly higher than in T6 (4.6%), T3 (1.5%), T7 (1.8%) and T8 (1.9%) and there was also embryo development. In other treatments, all embryos subjected to cryoprotectant solutions at a temperature of  $-13^{\circ}\text{C}$  and embryos subjected to treatments in liquid nitrogen resulted in dead embryos. It is concluded that the oocytes of *P. brachypomus* not resist the freezing curve, and the methanol solution with 3.1 M associated with 0.45 M of sucrose was the one that best preserved structures of embryos cooled to  $-13^{\circ}\text{C}$ .

**Key words:** cryoprotectant, freezing, embryos, oocytes.

### *Introdução*

A prática de conservação de sêmen, oócitos e embriões de peixes constituem um valioso recurso para a administração de programas reprodutivos e preservação de estoques genéticos de espécies que possam estar em risco de extinção (Komrakova e

Holtz, 2009). O processo de criopreservação consiste na conservação do material biológico em temperaturas ultrabaixas, com a finalidade de suspender o metabolismo e manter as células viáveis por um período de estocagem indeterminado, possibilitando a utilização posterior, assim continuando seu desenvolvimento, sem a perda da sua viabilidade (Pegg, 2007).

O sucesso da criopreservação de gametas de peixes pode também beneficiar o fornecimento para um banco de germoplasma global, aquicultura, recursos de conservação aquática e em pesquisas científicas (Liu et al., 2001; Cabrita et al., 2003). Embora o sucesso na criopreservação de oócitos e embriões de peixes ainda não seja uma realidade, a atual necessidade de preservação genética de gametas maternos tem incentivado a busca por protocolos de criopreservação efetivos (Zhang e Rawson, 2007; Robles et al., 2009).

A tecnologia da criopreservação pode ser realizada por diferentes métodos, entre eles estão a congelação a temperaturas próximas a 0°C, também chamado de resfriamento (Lopes et al., 2011), que interrompe o metabolismo da célula viva, e conserva o material por um determinado período de tempo. Outro método utilizado é a congelação lenta (Tsai et al., 2009), no qual o material biológico é conservado em nitrogênio líquido (-196°C) interrompendo o metabolismo da célula viva, e a viabilizando por tempo indeterminado.

Nas temperaturas próximas a 0°C, os embriões de peixes são susceptíveis às crioinjúrias, em virtude da formação de cristais de gelo e conseqüente rompimento das membranas celulares (Adams et al., 2003). A utilização de crioprotetores que sejam menos tóxicos às células é importante para reduzir os possíveis danos celulares e osmóticos durante o processo de congelação e descongelação, bem como a combinação entre crioprotetores internos e externos (Green, 2005).

Mesmo o resfriamento não sendo um processo de exposição extrema ao frio, como a criopreservação, ainda assim é necessária a utilização de crioprotetores, sejam eles internos, externos ou a combinação deles. Seguramente existem crioprotetores com um grau de toxicidade maior que outros, em uma mesma concentração. Segundo Zampolla et al. (2011) os crioprotetores internos menos tóxicos, em ordem crescente, são: metanol, DMSO e etileno glicol, resultado obtido para folículos ovarianos de *zebrafish* após exposição e criopreservação. O metanol também é reconhecido como o menos agressivo às células embrionárias de espécies neotropicais como o pacu (*Piaractus*

*mesopotamicus*) (Streit Junior et al., 2007) e o cascudo preto (*Rhinelepis aspera*) (Fornari et al., 2011).

A pirapitinga, *P. brachypomus* (Cuvier, 1818) pertencente à família Characidae, é uma espécie nativa da América do Sul, com distribuição nos rios Solimões-Amazonas, Orinoco e respectivos afluentes. A importância na piscicultura brasileira tem sido explorada em associação com o *Colossoma macropomum* na produção de híbridos. Seu desenvolvimento embrionário deve ocorrer na temperatura de 26°C, e período de tempo até a eclosão das larvas varia entre 16 a 18 horas (Vásquez-Torres, 2005).

O objetivo deste estudo foi avaliar a sensibilidade dos oócitos de *P. brachypomus* expostos a diferentes soluções crioprotetoras em temperatura ambiente e criopreservado, e embriões submetidos a diferentes concentrações de crioprotetores internos e externos, a congelamento em -13°C e em nitrogênio líquido.

### *Material e Métodos*

#### *Experimento 1. Congelamento de oócitos de P. brachypomus*

Um mil e cinquenta oócitos de duas fêmeas, com peso médio de 3,65 ±0,5kg, de *P. brachypomus* (525 de cada animal), foram coletados após a extrusão, homogeneizados e em seguida colocados em solução de Hank (Cultilab®) (Isayeva et al., 2004) e em meio Leibovitz L15 (Cultilab®) diluído 50% em água ultrapura (Tsai et al., 2009) para manutenção da viabilidade. As soluções crioprotetoras foram elaboradas com base em trabalhos realizados por Streit Junior et al. 2007 e Digmayer (2010).

#### *Avaliação da sensibilidade dos oócitos*

Os oócitos foram distribuídos em oito tratamentos (Tab. 1) considerando-se a composição das soluções crioprotetoras e um tratamento controle (oócitos sem passar pela solução crioprotetora). Em cada um dos tratamentos foram utilizados 90 oócitos (3 repetições compostas por 30 oócitos), totalizando nesta etapa 810 oócitos.

Tabela 1. Composição dos crioprotetores internos (metanol e DMSO) e externo (sacarose) das soluções crioprotetoras para oócitos de *Piaractus brachypomus*.

Tratamentos	Metanol (M)	DMSO (M)	Sacarose (M)	50% L15 (q.s.p.)	Solução Hank (q.s.p.)
1	1,6	-	0,25	20ml	-
2	3,1	-	0,25	20ml	-
3	-	0,7	0,25	20ml	-
4	-	1,3	0,25	20ml	-
5	1,6	-	0,25	-	20ml
6	3,1	-	0,25	-	20ml
7	-	0,7	0,25	-	20ml
8	-	1,3	0,25	-	20ml
Controle de desenvolvimento	-	-	-	-	-

Os oócitos foram mantidos nos tratamentos por 20 minutos, em temperatura ambiente (28,4°C). Após esse período, amostras contendo 10 oócitos/tratamento foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5%, utilizando o tampão fosfato de sódio 0,1M em pH 7,2 para análise morfológica em Microscopia Óptica (MO). Oitenta oócitos de cada tratamento foram fertilizados com 30 µl de sêmen fresco obtido a partir de um único macho evitando efeito do indivíduo, com motilidade progressiva e vigor espermático de 100:5, respectivamente, e mantidos em incubadoras experimentais por aproximadamente 16 horas até o momento de quantificação dos embriões mortos (que não se desenvolveram) e embriões desenvolvidos (identificados a partir do estágio de cauda solta).

#### *Processamento Histológico em Historesina*

Amostras de oócitos foram transferidas para álcool 70% e posteriormente desidratadas em concentrações crescentes de álcool até 100%. Em seguida foram transferidos para solução de infiltração (resina com ativador) na proporção de 1:1 e estocados overnight a 4°C em solução de infiltração. Após este período o material foi incluso em formas específicas com solução de infiltração com endurecedor, e os blocos obtidos permaneceram em estufa a 37°C por aproximadamente 10 dias para secagem. Os blocos foram então, submetidos à microtomia para obtenção de cortes seriados de 2 µm de espessura (micrótomo RM2245 Leica®), colocados sobre lâminas de vidro e corados pelo método de hematoxilina-floxina (Tolosa et al., 2003). As imagens foram

capturadas em microscópio óptico de luz (BX 41 Olympus®) acoplado com câmara de alta resolução, através do programa Q Capture Pro 51.

#### *Avaliação da sensibilidade dos oócitos a congelação lenta*

Após manutenção dos oócitos nas soluções crioprotetoras por 20 minutos em temperatura ambiente da água de 28,4°C, estes foram envasados em palhetas de 0,5 ml e levados ao congelador programável Dominion K (Biocom®), para avaliação da efetividade dos tratamentos. Na temperatura de -7°C foi realizado o *seeding* e a curva de congelação utilizada foi de 1,0°C/minuto. Ao final da congelação, as palhetas foram transferidas e mantidas em nitrogênio líquido pelo tempo proposto de um mês.

Posteriormente os oócitos foram descongelados (banho-maria a 30°C/15 segundos e transferidos para a solução de hank ou 50% meio L15, conforme utilizado no tratamento), sendo que 10 oócitos/tratamento foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5%, utilizando o tampão fosfato de sódio 0,1M em pH 7,2, para análise morfológica em MO (previamente reportado) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Como padrão de eclosão das larvas vinte oócitos/tratamento foram fertilizados com sêmen congelado, com parâmetros de 20:2 de motilidade progressiva e vigor espermático, respectivamente, pois não havia disponibilidade de sêmen fresco. Em seguida os ovos foram mantidos em incubadoras experimentais para verificar possível desenvolvimento embrionário.

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

Amostras de oócitos foram lavadas e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% (por 4 horas), em seguida lavadas em tampão e submetidas à desidratação em série crescente de etanol. A secagem do material foi obtida ao ponto crítico com líquido CO<sub>2</sub> e as peças montadas em suporte para em seguida serem metalizadas com ouro-paládio. As amostras foram examinadas e eletromicrografadas em MEV (JSM - 5410 JEOL®).

#### *Experimento 2. Congelação de embriões de P. brachypomus*

##### *Congelação de embriões a -13°C por oito horas*

Após a coleta dos embriões mantidos em incubadora, foram selecionados 1800 embriões viáveis de *P. brachypomus* em estágio de 90% de epibolia (após seis horas de incubação em temperatura de 28°C) (Fig. 1), utilizando estereomicroscópio (SMZ 140/143 Motic®).



Figura 1. Embrião de *P. brachypomus* em estágio de 90% de epibolia (esquerda) e embrião morto (direita). Imagem obtida em estereomicroscópio com aumento de 20X.

Os embriões foram distribuídos em oito tratamentos, considerando a composição das soluções crioprotetoras (Tab. 2), além do controle (tratamento nove) embriões *in natura*, para verificação da qualidade padrão dos embriões. Duzentos embriões/tratamento foram distribuídos em três repetições e submetidos ao processo de congelação “step by step” com estabilização a cada 10°C, de acordo com Lopes et al. (2011). Inicialmente os embriões estavam em 28°C passaram para 20°C permanecendo por 10 minutos, em seguida redução de mais 10°C e novamente estabilizando por 10 minutos. Na terceira etapa, reduziu-se mais 10°C e estabilizados por 10 minutos na temperatura de 0°C para em seguida serem encaminhados e mantidos em congelador (-13°C) por 8 horas. A elaboração das soluções crioprotetoras e o tempo de permanência no congelador foi baseado em trabalhos realizados por Streit Junior et al. (2007) e Digmayer (2010).

Tabela 2. Composição das soluções crioprotetoras para embriões de *P. brachypomus*, submetidos a congelação (-13°C).

Tratamentos	Metanol (M)	PVP* (M)	Sacarose (M)	Solução de Hank (q.s.p.)
1	3,1	0,15	-	20ml
2	3,1	0,30	-	20ml
3	3,1	0,45	-	20ml
4	3,1	0,60	-	20ml
5	3,1	-	0,45	20ml
6	3,1	-	0,63	20ml
7	3,1	-	0,81	20ml
8	3,1	-	0,99	20ml
Controle de desenvolvimento	-	-	-	-

\* PVP: polivinilpirrolidona.

Os embriões foram retirados do congelador (-13°C), sendo que 20 amostras/tratamento foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5%, utilizando o tampão fosfato de sódio 0,1M em pH 7,2 para análise morfológica a partir de amostras incluídas em historesina, conforme descrito no experimento 1.

Cento e oitenta embriões foram levados às incubadoras para continuarem o desenvolvimento embrionário, por aproximadamente sete horas, até o tempo de eclosão das larvas, sendo avaliados em embriões desenvolvidos (identificados a partir do estágio de cauda solta) e embriões mortos (que não se desenvolveram).

#### *Congelamento de embriões em nitrogênio líquido*

Os embriões de *P. brachypomus* foram selecionados em estágio de *tailbud* (broto) e distribuídos em quatro tratamentos (Tab. 3) considerando a composição das soluções crioprotetoras. Para cada tratamento foram utilizados 30 embriões, que permaneceram 20 minutos nas soluções crioprotetoras, em seguida envasados em palhetas de 0,5 ml, sendo distribuídos em três palhetas com 10 embriões cada, totalizando nesta etapa 120 embriões.

Tabela 3. Composição das soluções crioprotetoras para embriões de *P. brachypomus*, submetidos a congelamento em nitrogênio líquido.

Tratamentos	Metanol (M)	Sacarose (M)	Solução de Hank (q.s.p.)
1	3,1	0,45	20ml
2	3,1	0,63	20ml
3	3,1	0,81	20ml
4	3,1	0,99	20ml

As palhetas foram levadas ao congelador programável Dominion K (Biocom®), sendo que na temperatura de -7°C foi realizado o *seeding* e a curva de congelamento utilizada foi de 1,0°C/minuto. Ao final da congelamento as palhetas foram transferidas para o botijão de nitrogênio líquido (-196°C). Decorrido o tempo proposto de criopreservação de um mês, os embriões foram descongelados sendo que 20 embriões/tratamento foram mantidos em incubadoras experimentais para verificar possível finalização do desenvolvimento embrionário, e outra parte foi fixada em solução de glutaraldeído 2,5%, utilizando o tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2, para análise morfológica dos embriões em MO.

### *Análise estatística*

Nos trabalhos de oócitos e congelação de embriões a  $-13^{\circ}\text{C}$ , avaliaram-se as diferenças estatísticas entre os tratamentos, por meio da metodologia de modelos lineares generalizados. Para tanto, estimando as probabilidades de embriões desenvolvidos para cada grupo e realizando a comparação destas, por meio do teste de qui-quadrado implementado no Proc GENMOD do SAS. No processo de estimação, utilizou-se a função ligação logit considerando que os resíduos apresentaram distribuição binomial.

No trabalho de congelação de embriões em nitrogênio líquido, estimou-se a frequência relativa de embriões preservados após a descongelação.

### *Resultados*

#### *Experimento 1. Congelação de oócitos de *P. brachypomus**

##### *Avaliação da sensibilidade dos oócitos*

A figura 2A representa a morfologia de oócitos preservados mantidos nas soluções crioprotetoras em temperatura ambiente ( $28,4^{\circ}\text{C}$ ), com contorno e integridade da zona radiata e grânulos de vitelo acidófilos, indicando preservação da estrutura. Após fertilização foram obtidos embriões *P. brachypomus* em desenvolvimento (Fig. 2B) e mortos (Fig. 2C).

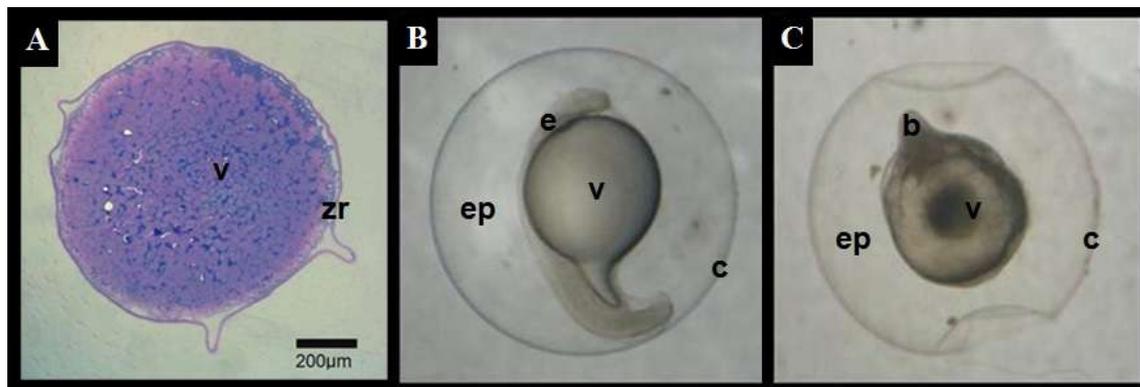


Figura 2. Oócitos e embriões de *P. brachypomus*. Oócito (A) (coloração com hematoxilina-floxina), embrião em desenvolvimento (B) e embrião morto (C) (estereomicroscópio com aumento de 20X). Evidenciando vitelo (v), zona radiata (zr), embrião (e), espaço perivitelino (ep), córion (c), blastoderme (b).

A porcentagem de embriões desenvolvidos no grupo controle, oócitos *in natura*, foi de 97,7%. Os tratamentos 5 (metanol 1,6M + sacarose 0,25M + solução Hank) e 7 (DMSO 0,7M + sacarose 0,25M + solução Hank) resultaram embriões desenvolvidos em percentual de 17,3% e 1,8%, respectivamente. Os demais tratamentos resultaram em embriões mortos (Tab. 4).

Tabela 4. Probabilidade de ocorrência de embriões desenvolvidos e embriões mortos de *P. brachypomus* após submissão dos oócitos em diferentes tratamentos com solução crioprotetora em temperatura ambiente (28,4°C).

Tratamentos	Embriões (%)	
	Desenvolvidos	Mortos
1	0,0 <sup>d</sup>	100 <sup>a</sup>
2	0,0 <sup>d</sup>	100 <sup>a</sup>
3	0,0 <sup>d</sup>	100 <sup>a</sup>
4	0,0 <sup>d</sup>	100 <sup>a</sup>
5	17,3 <sup>b</sup>	82,7 <sup>c</sup>
6	0,0 <sup>d</sup>	100 <sup>a</sup>
7	1,8 <sup>c</sup>	98,2 <sup>b</sup>
8	0,0 <sup>d</sup>	100 <sup>a</sup>
Controle de desenvolvimento	97,7 <sup>a</sup>	2,3 <sup>d</sup>

\* colunas com diferentes letras sobrescritas apresentam diferença estatística em nível de significância de 5% (p<0,05).

#### *Avaliação da sensibilidade dos oócitos a congelação lenta*

Apesar da preservação morfológica evidenciada na maioria dos oócitos submetidos a congelação lenta com manutenção do contorno e integridade da zona radiata e vitelo, semelhantes ao obtido em oócitos em temperatura ambiente da água (Fig. 3), não foi obtido sucesso no processo de fertilização. Uma hora após os oócitos terem sido descongelados, fertilizados e incubados, em todos os tratamentos o material biológico resultante não suportou o processo de hidratação e se desintegrou.

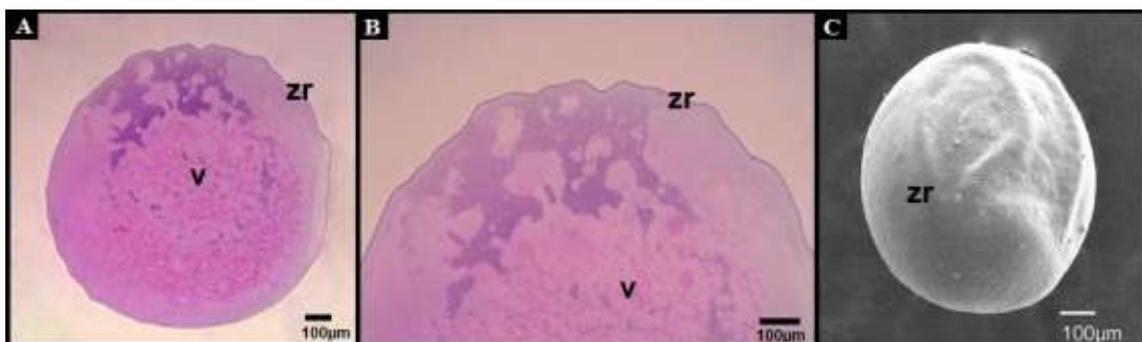


Figura 3. Fotomicrografia de oócitos de *P. brachypomus* criopreservados com solução de 1,6M metanol + 0,25M sacarose + solução Hank (T5), coradas com hematoxilina-floxina (A, B) e em MEV (C). Vitelo (v) e zona radiata (zr).

### Experimento 2. Congelação de embriões de *P. brachypomus*

#### Congelação de embriões a $-13^{\circ}\text{C}$ por oito horas

No controle, a porcentagem de embriões desenvolvidos foi de 98,7%. No T5, 15,3% dos embriões se desenvolveram e foi significativamente maior que no T6 (4,6%); T3 (1,5%); T7 (1,8%) e T8 (1,9%) em que também houve desenvolvimento embrionário (Tab. 5). Nos demais tratamentos, todos os embriões submetidos às soluções crioprotetoras em temperatura de  $-13^{\circ}\text{C}$ , não houve desenvolvimento embrionário.

Tabela 5. Probabilidade de ocorrência de embriões desenvolvidos e embriões mortos, após a incubação dos embriões de *P. brachypomus* que permaneceram por oito horas a  $-13^{\circ}\text{C}$  em diferentes soluções crioprotetoras.

Tratamentos	Embriões (%)	
	Desenvolvidos	Mortos
1	0,0 <sup>d</sup>	100 <sup>a</sup>
2	0,0 <sup>d</sup>	100 <sup>a</sup>
3	1,5 <sup>c</sup>	98,5 <sup>b</sup>
4	0,0 <sup>d</sup>	100 <sup>a</sup>
5	15,3 <sup>b</sup>	84,7 <sup>c</sup>
6	4,6 <sup>c</sup>	95,4 <sup>b</sup>
7	1,8 <sup>c</sup>	98,2 <sup>b</sup>
8	1,9 <sup>c</sup>	98,1 <sup>b</sup>
Controle de desenvolvimento	98,7 <sup>a</sup>	1,3 <sup>d</sup>

\* colunas com diferentes letras sobrescritas apresentam diferença estatística em nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

Para elucidação da morfologia dos embriões de *P. brachypomus* descongelados, após oito horas no congelador ( $-13^{\circ}\text{C}$ ), além do controle *in natura* foram selecionados os tratamentos T5, T8 e T4 que apresentaram maior, menor e nenhuma ocorrência de

embriões desenvolvidos, respectivamente (Fig.4). Nas figuras 4A e 4B (*in natura*), observou-se córion íntegro, porém, blastoderme desorganizada e por vezes ausente. Nas figuras 4C e 4D (T5) os embriões foram caracterizados pela presença de córion íntegro, blastoderme definida envolvendo o vitelo, não sendo detectados danos celulares visíveis. Nas figuras 4E e 4F (T8), constatou-se morfologia alterada com córion rompido e conseqüente extravasamento de vitelo, blastoderme desorganizada e por vezes ausente. Nas figuras 4G e 4H (T4), observou-se o córion íntegro e blastoderme definida com grânulos de vitelo também definidos.

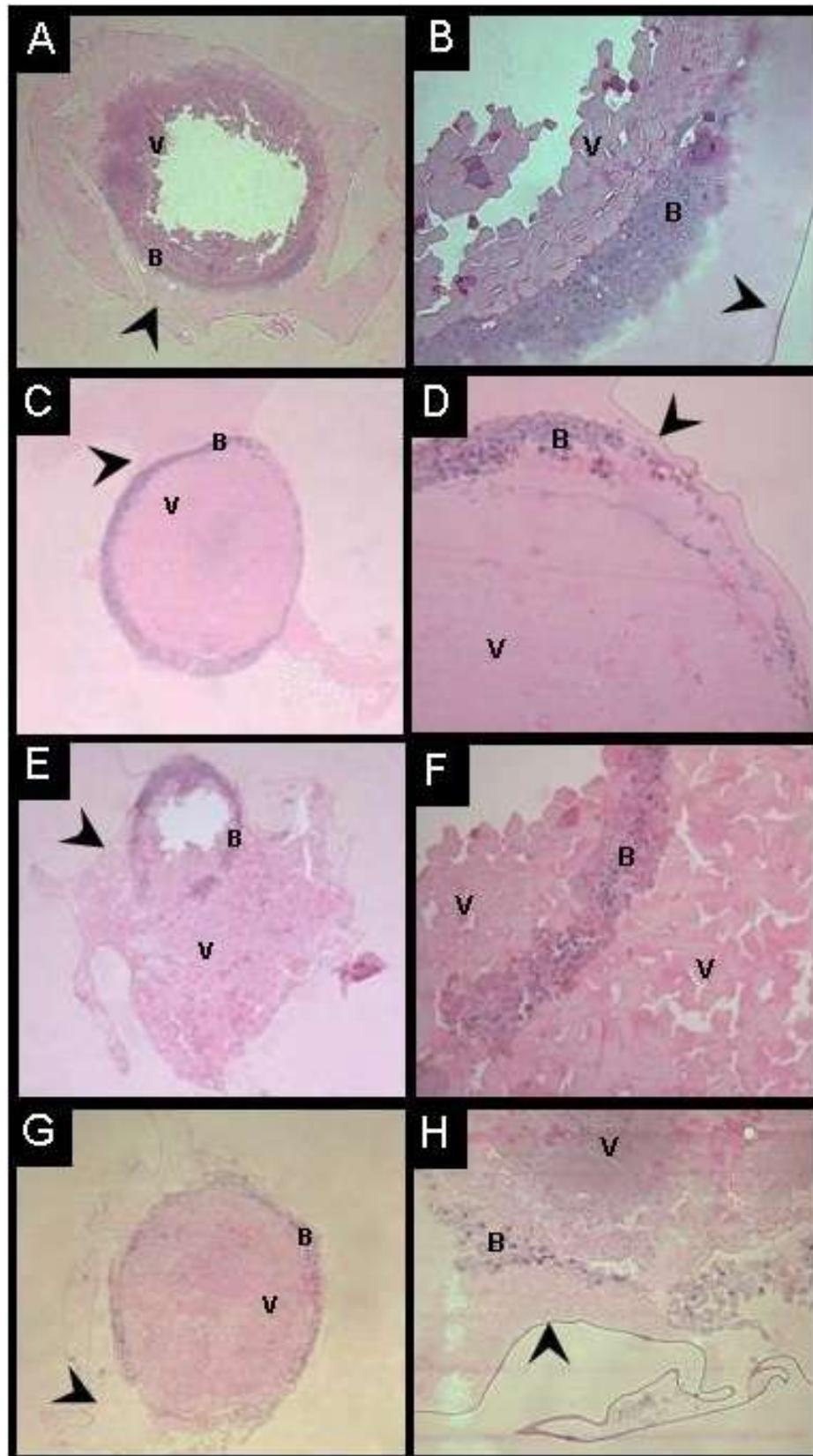


Figura 4. Fotomicrografia de embriões de *P. brachypomus in natura* (A, B), após permanecerem oito horas a  $-13^{\circ}\text{C}$  em solução de metanol 3,1M e sacarose 0,45M (C, D), metanol 3,1M e sacarose 1,0M (E, F), metanol 3,1M e PVP 0,6M (G, H). Corados com hematoxilina-floxina. Blastoderme (B), vitelo (V) e córion (cabeça de seta). Aumento de 40X (figuras A, C, E e G) e 200X (figuras B, D, F e H).

### *Congelação de embriões em nitrogênio líquido*

Na figura 5, estão representadas as morfologias dos embriões de *P. brachypomus* submetidos à congelação, descongelação e fixação. A partir das imagens obtidas em MO foi estimado o percentual de embriões preservados (5A, B) e não preservados (5C, D). Nos tratamentos 1 (metanol 3,1M + sacarose 0,45M) e 4 (metanol 3,1M + sacarose 1,0M), constatou-se 44% e 40 % de preservação embrionária, respectivamente. A preservação é caracterizada por ausência de alterações morfológicas, com blastoderme bem definida, córion sem rompimento, vitelo acidófilo, com ausência de falhas, bem fechado e uniforme. Nos tratamentos 2 (metanol 3,1M + sacarose 0,63M) e 3 (metanol 3,1M + sacarose 0,81M), não houve preservação dos embriões, estes encontravam-se com a blastoderme desorganizada, fusão dos grânulos de vitelo e irregularidade na forma. A maior parte dos embriões, de todos os tratamentos, apresentava o córion sem rompimento.

Em todos os tratamentos, os embriões submetidos à congelação, descongelação e incubados resultaram em embriões mortos, sendo que com o tempo se desintegraram.

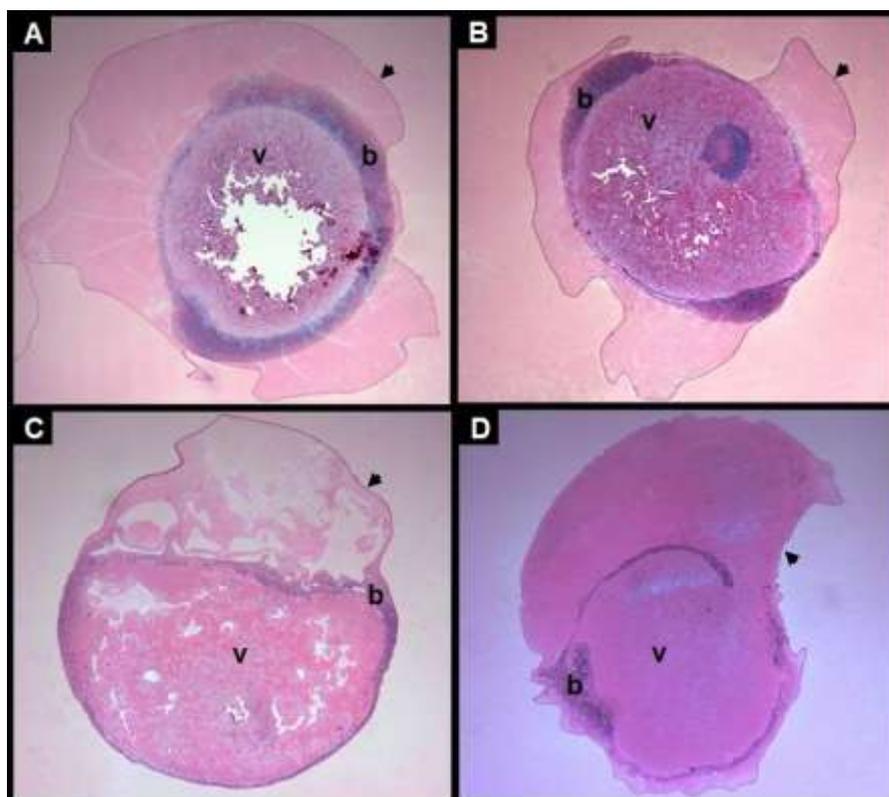


Figura 5. Fotomicrografia de embriões de *P. brachypomus* após congelação em solução de metanol 3,1M e sacarose 0,45M (A), metanol 3,1M e sacarose 0,63M (B), metanol 3,1M e sacarose 0,81M (C), e metanol 3,1M e sacarose 1,0M (D). Blastoderme (b), vitelo (V) e córion (cabeça de seta). Corados com hematoxilina-floxina, em aumento de 40X.

## Discussão

### Oócitos

Os oócitos de *P. brachypomus* não suportaram o processo de congelamento lenta ao qual foram submetidos, porém, informações importantes foram obtidas a partir deste resultado. Como os oócitos submetidos aos T5 e T7 em temperatura ambiente estavam aptos a serem fertilizados, é possível afirmar que a curva de resfriamento na qual os oócitos foram submetidos foi determinante para a sua inviabilização, já que nestes tratamentos não houve desenvolvimento embrionário após o processo de congelamento. Esses resultados indicam que devem ser conduzidos outros estudos com diferentes curvas de resfriamento de oócitos de *P. brachypomus*.

O resultado de inviabilização dos oócitos depois de submetidos a diferentes soluções crioprotetoras e em seguida a curva de resfriamento pode ser explicado pela diferença da ação de entrada da solução crioprotetora no oócito. Este fato é relatado por Zhang et al. (2005) com oócitos de *D. rerio*, que verificaram que a temperatura reduziu a permeabilidade da membrana. Os autores ainda relataram que os parâmetros da permeabilidade da membrana dos oócitos variam nas diferentes espécies e estádios de desenvolvimento dos oócitos.

Neste estudo de avaliação da sensibilidade dos oócitos a diferentes soluções crioprotetoras em temperatura ambiente, foi constatado que as molaridades de metanol e DMSO mais elevadas foram extremamente tóxicas para os oócitos, não permitindo o desenvolvimento de nenhum embrião. Seguramente, o aumento na concentração dos crioprotetores acarreta aumento da toxidez da solução crioprotetora, como registraram Plachinta et al. (2004) avaliando oócitos de *D. rerio*. Com relação ao processo tóxico produzido pelo aumento da concentração do metanol, Zampolla et al. (2010) relataram que este crioprotetor provoca a inativação das mitocôndrias, produzindo distribuição alterada nos folículos ovarianos do *D. rerio* em estágio III. Em outro estudo com folículo ovariano em estágio III de *D. rerio*, Zampolla et al. (2009) constataram que a exposição a 2M de metanol induziu uma perda no potencial de membrana, mas não encontrou nenhuma redução na sobrevivência após cinco horas de incubação. Os autores ainda verificaram que a utilização de altas concentrações de metanol (3 e 4M) provocou além da redução no potencial de membrana, a perda no arranjo mitocondrial

comprometendo sua função. Esta observação dos autores pode explicar a inviabilização do processo de criopreservação das estruturas oocitárias do *P. brachypomus*.

### *Embriões*

Ao retirar os embriões da temperatura de  $-13^{\circ}\text{C}$  verificou-se que algumas amostras estavam congeladas (aspecto opaco), ou seja, a combinação das molaridades dos crioprotetores intra e extracelulares não foram suficientes para evitar a formação de gelo. Muito embora os resultados com os embriões de *P. brachypomus* não tenham sido satisfatórios, o tratamento T5 foi o melhor resultado no presente estudo. Fato que coincidiu com o estudo por Streit Junior et al. (2007) com *P. mesopotamicus*, inclusive quanto ao estágio de desenvolvimento embrionário, sugerindo a eficiência da associação de crioprotetores internos e externos no processo de congelação de embriões a temperaturas próximas de  $0^{\circ}\text{C}$ .

A associação positiva da sacarose a outros crioprotetores foi verificada por Woelders (1997), os quais ressaltaram que a estabilidade da membrana celular dos embriões é fundamental na prevenção de deformidades mecânicas provocadas pela saída da água e entrada do crioprotetor na célula, durante o processo de congelação. Farkas et al. (2001) também ressaltaram a necessidade da manutenção estrutural e funcional da camada fosfolipídica dos embriões quando expostos a novas temperaturas.

Os embriões de *P. brachypomus* não responderam positivamente quanto a utilização do PVP, quando comparado a sacarose. Neste caso, pode-se atribuir resultados positivos na utilização de sacarose nas soluções crioprotetoras em função da osmolaridade do tampão proporcionado por elas. De acordo com Leibo (1984) a sacarose é capaz de regular a velocidade de entrada e de saída do crioprotetor em embriões bovinos, mantendo a concentração constante do meio extracelular e evitando desse modo o choque osmótico. Segundo Vásquez-Torres (2005) pelo fato do desenvolvimento do embrião ser um processo muito delicado, qualquer ocorrência atípica pode causar danos irreversíveis e irreparáveis. Lopes et al. (2011) sugeriram que a permeabilidade da membrana e o controle da osmorregulação nos diferentes compartimentos do embrião, que são fatores relacionados às crioinjúrias, devem ser considerados durante o resfriamento, para o aumento da sobrevivência das larvas eclodidas.

Com as imagens de MO foi possível verificar que os embriões que passaram pelo resfriamento possuíam uma desorganização celular, identificada por “falhas” na

blastoderme. Dobrinsky (1996) estudando embriões de peixes verificou que a criopreservação pode ser extremamente prejudicial, pois a formação de gelo pode lesar as membranas plasmáticas, o armazenamento em nitrogênio líquido pode desnaturar as organelas celulares e destruir o citoesqueleto do embrião. Ressalta ainda que se o citoesqueleto é danificado ou desestabilizado, o embrião pode perder a sua via intracelular de comunicação causando destruição irreparável da célula. O procedimento de criopreservação pode causar a fragmentação do DNA, mesmo na ausência de deformidades celulares (Carvalho et al., 2012), bem como alterações deixando os cromossomos (Burgoyne et al., 1991), despolimerizar microtúbulos e microfilamentos, causando a destruição dos componentes do citoesqueleto (Dobrinsky, 2002), inviabilizando os oócitos.

As lesões nos embriões congelados, verificadas no presente trabalho, corroboram com Neves et al. (2012), que constataram lesões nas membranas plasmáticas dos grânulos de vitelo de embriões de *Piaractus mesopotamicus*, sugerindo que esses danos podem ser causados pelo processo de criopreservação, pela exposição a baixas temperaturas, penetração insuficiente dos crioprotetores ou toxidez da solução crioprotetora. Cabrita et al. (2006) e Janik et al. (2000) classificaram o vitelo como o compartimento em que se tem o maior índice de injúrias, provocado pela insuficiente permeação dos crioprotetores.

Concluindo, os oócitos de *P. brachypomus* não resistiram à curva de congelação testada, mesmo na solução menos tóxica (metanol 1,6M associado à sacarose 0,25M) em temperatura ambiente. Quanto aos embriões congelados a  $-13^{\circ}\text{C}$ , a solução com metanol 3,1M associado à sacarose 0,45M foi quem melhor preservou as estruturas, corroborando com a solução padrão para Characidae. Com relação aos embriões congelados em nitrogênio líquido, apesar de não se ter obtido desenvolvimento embrionário após a descongelação e incubação, os resultados indicam que as soluções de metanol 3,1M associado à sacarose 0,45M, e metanol 3,1M associado à sacarose 1,0M, mantiveram a preservação embrionária durante todo o procedimento de criopreservação. Para se desenvolver um protocolo de criopreservação de oócitos e embriões de peixes são necessários mais estudos com diferentes tempos de exposição, diferentes concentrações de crioprotetores internos e externos, sendo recomendado o metanol como crioprotetor interno e sacarose como crioprotetor externo, por demonstrarem menor toxicidade aos oócitos e embriões de *P. brachypomus*.

## Referências

- Adams, S.L., Kleinhans, F.W., Mladenov, P.V., Hessian, P.A. (2003). Membrane permeability characteristics and osmotic tolerance limits of sea urchin (*Evechinus chloroticus*) eggs. *Cryobiology*, v.47, p.1-13.
- Burgoyne P.S., Holland K., Stephens R. (1991). Incidence of numerical chromosome anomalies in human pregnancy estimation from induced and spontaneous abortion data. *Human Reproduction*, p.6, n.4, p.555-565.
- Cabrita, E., Robles, V., Chereguini, O., Wallace, J.C., Herráez, M.P. (2003). Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). *Cryobiology*, v.47, p.204-213.
- Cabrita, E., Robles, V., Wallace, J.C. (2006) Preliminary studies Cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. *Aquaculture*, v.251, p.245-255.
- Carvalho, A.A., Faustino, L.R., Castro, S.V., Figueiredo, J.R., Rodrigues, A.P.R. (2012). Caracterização dos danos celulares em gametas femininos e embriões após criopreservação. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.40, n.3, p.1046.
- Digmayer, M. (2010). Viabilidade de embriões de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), submetidos a -8°C e, diferentes concentrações de crioprotetores. Maringá. 46p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá.
- Dobrinsky, J.R. (1996). Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, v.45, p.17-26.
- Dobrinsky J.R. (2002). Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*, v.57, n.1, p.285-302.
- Farkas, T., Fodor, E., Kitajka, K., Halver, J.E. (2001) Response of fish membranes to environmental temperature. *Aquaculture Research*, v.32, p.645-655.
- Fornari, D.C., Ribeiro, R.P., Streit Junior, D.P., Godoy, L.C., Neves, P.R., Oliveira, D., Sirol, R.N. (2011). Effect of cryoprotectants on the survival of cascudo preto (*Rhinelepis aspera*) embryos stored at -8°C. *Zygote*, v.26, p.1-6.
- Green, R.E. (2005). Princípios e técnicas da vitrificação de embriões dos animais domésticos. Botucatu. 21p. Monografia - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- Isayeva, A., Zhang, T., Rawson, D.M. (2004). Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. *Cryobiology*, v.49, p.114-122.
- Janik, M., Kleinhans, F.W., Hagedorn, M. (2000) Overcoming a permeability by microinjecting cryoprotectants into zebrafish embryos (*Brachidanio rerio*). *Cryobiology*, v.41, p.25-34.
- Komrakova, M, Holtz, W. (2009). Factors responsible for successful chilled storage of unfertilized rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Aquaculture*, v.286, p.156-163.
- Leibo, S.P. (1984). A one-step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, v.21, p.767-790.
- Liu, X.H.; Zhang,T.; Rawson, D.M. (2001). Effect of cooling rate and partial removal of yolk on the chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology*, v.55, p.1719-1731.
- Lopes, T.S., Romagosa, E., Streit Junior, D.P., Ribeiro, R.P., Digmayer, M. (2011). Cooling of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos at various stages of development for 6 or 10 hours. *Theriogenology*, v.75, p.570-576.
- Neves, P.R., Ribeiro, R.P., Streit Junior, D.P., Natali, M.R.M., Fornari, D.C., Santos, A.I., Godoy, L.C. (2012) Injuries in pacu embryos (*Piaractus mesopotamicus*)

after freezing and thawing. Zygote, disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/S096719941200024X>>. Acessado em 26/11/2012.

Pegg, D.E. (2007) Principles of cryopreservation. In: Cryopreservation and freeze-drying protocols. Day, J.G. e Stacey, G.N. Editores. Humana Press Inc. p.39-57.

Plachinta, M., Zhang, T., Rawson, D.M. (2004). Studies on cryoprotectant toxicity to zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. *CryoLetters*, v.25, p.415-424.

Robles, V., Cabrita, E., Herráez, M.P. (2009). Germplasm cryobanking in zebrafish and other aquarium model species. *Fish Haus*, v.6, n3, p.281-293.

Streit Junior., D.P., Digmayer, M., Ribeiro, R.P., Sirol, R.N., Morais, V.G., Galo, J. (2007). Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, n.42, v.8, p.1199-1202.

Tolosa, E.M.G., Behmer, O.A., Freitas Neto, A.G. (2003). Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: Edart, Edusp, 240p.

Tsai, S., Rawson, D.M., Zhang, T. (2009).. Studies on chilling sensitivity of early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. *Cryobiology*, v.58, p.279-286.

Vásquez-Torres, W. (2005). A pirapitinga, reprodução e cultivo. In: Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Baldisserotto, B. e Gomes, L.C. Editores. Santa Maria: Ed. Da UFSM. 470p.

Woelders, H. (1997) Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *The Veterinary Quarterly*, v.19, p.135-138.

Zampolla, T., Spikings, E., Zhang, T., Rawson, D.M. (2009). Effect of methanol and DMSO exposure on mitochondrial activity and distribution in stage III ovarian follicles of zebrafish *Danio rerio*. *Abstracts/Cryobiology*, v.59, p.413.

Zampolla, T., Spikings, E., Zhang, T., Rawson, D.M. (2010). Investigation of methanol impact on mitochondrial transport and cytoskeleton proteins in zebrafish (*Danio rerio*) stage III ovarian follicles. *Abstracts / Cryobiology*, v.61, p.385.

Zampolla, T., Spikings, E., Srirangarajah, S., Rawson, D.M., Zhang, T. (2011). Impact of cryoprotectants and cryopreservation on metabolic activity and cytoskeleton proteins of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian fragments. *CryoLetters*, v.32, n.6, p.525-536.

Zhang, T., Isayeva, A., Adams, S.L., Rawson, D.M. (2005). Studies on membrane permeability of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes in the presence of different cryoprotectants. *Cryobiology*, v.50, p.285-293.

Zhang, T., Rawson, D.M. (2007). Cryo-conservation in fish: the potentials and challenges. *Abstracts/ Cryobiology*, v.55, p.354.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A solução crioprotetora menos tóxica aos oócitos de *Colossoma macropomum* foi a associação de metanol 1,6M com 0,25M sacarose. Apesar da avaliação morfológica dos oócitos indicarem conservação de algumas estruturas oocitárias após a congelação e descongelação, mesmo a solução crioprotetora considerada menos tóxica, não foi eficiente na manutenção da fertilidade dos oócitos após a congelação.

A associação de metanol 1,6M com sacarose 0,25M foi considerada a menos tóxica para oócitos de *Piaractus brachypomus*, ainda assim não foi eficiente para a manutenção da fertilidade dos oócitos após a congelação, descongelação e fertilização. Para os embriões de *P. brachypomus* congelados à -13°C por oito horas e mantidos em incubadoras, a solução de metanol 3,1M associado à sacarose 0,45M, foi a que melhor preservou as estruturas embrionárias. Com relação aos embriões congelados em nitrogênio líquido, apesar de não ter sido verificado desenvolvimento embrionário após a descongelação e incubação, sugere-se que as soluções de metanol 3,1M associado a sacarose 0,45M e metanol 3,1M associado a sacarose 1,0M, mantiveram a preservação embrionária durante todo o procedimento de criopreservação.

Para se desenvolver um protocolo de criopreservação de oócitos e embriões de peixes são necessários mais estudos com diferentes tempos de exposição, diferentes concentrações de crioprotetores internos e externos, sendo recomendado o metanol como crioprotetor interno e sacarose como crioprotetor externo, por demonstrarem menor toxicidade aos oócitos e embriões de *C. macropomum* e *P. brachypomus*.