



ALÉSSIO BATISTA MILIORINI

**RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO DE EMBRIÕES DE
DOURADO (*Salminus brasiliensis*),
PIRACANJUBA (*Brycon orbignyanus*) E
PIAPARA (*Leporinus obtusidens*)**

LAVRAS - MG

2012

ALÉSSIO BATISTA MILIORINI

**RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO DE EMBRIÕES DE DOURADO
(*Salminus brasiliensis*), PIRACANJUBA (*Brycon orbignyanus*) E
PIAPARA (*Leporinus obtusidens*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Luis David Solis Murgas

LAVRAS - MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Miliorini, Aléssio Batista.

Resfriamento e congelamento de embriões de dourado (*Salminus brasiliensis*), piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e piapara (*Leporinus obtusidens*) / Aléssio Batista Miliorini. – Lavras : UFLA, 2012.

138 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Luis David Solis Murgas.

Bibliografia.

1. Peixes de água doce. 2. Criopreservação. 3. Crioprotetores. 4. Dimetilsulfóxido. 5. Metanol. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.375

ALÉSSIO BATISTA MILIORINI

**RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO DE EMBRIÕES DE DOURADO
(*Salminus brasiliensis*), PIRACANJUBA (*Brycon orbignyanus*) E
PIAPARA (*Leporinus obtusidens*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 11 de julho de 2012.

Dra. Priscila Vieira e Rosa	UFLA
Dra. Gláucia Frasnelli Mian	UFLA
Dr. Antônio Carlos Cunha Lacreta Júnior	UFLA
Dr. Laércio dos Anjos Benjamin	UFV

Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador

LAVRAS - MG

2012

*A minha doce e amada Alice, filha tão desejada e motivo maior de minha
existência.*

A minha esposa Raquel, pelo amor e carinho constantes.

*A meus pais, João e Regina, pessoas simples em seus modos, mas tão sublimes
em seus ensinamentos.*

*A todos os animais, seres vivos tão impressionantemente apaixonáveis, por
cuja admiração e vulnerabilidade serei eterno protetor.*

*A Deus, por sua infinita bondade e por mais esta oportunidade de me tornar
melhor.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, por todo conhecimento durante todos estes anos.

Ao orientador e amigo, Prof. Luis David Solis Murgas, por quem tenho profunda admiração e a quem devo a oportunidade de ter concluído este doutoramento.

À grande amiga Michelle Sampaio Paulino, pesquisadora destemida e sempre presente.

À Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG) e a toda equipe da Estação Ambiental de Itutinga, pela fundamental cooperação.

Enfim, a todos que contribuíram para minha formação, e a DEUS, que a todos observa e de todos cuida em cada momento de nossas jornadas.

“Não há nada de nobre em sermos superiores ao próximo. A verdadeira nobreza
consiste em sermos superiores ao que éramos antes”.

O autor

RESUMO

A criopreservação de gametas e embriões de espécies aquáticas oferece muitos benefícios para as áreas de conservação da biodiversidade, mas, até o momento, nenhum protocolo foi capaz de obter embriões viáveis após o congelamento com a reprodutibilidade e eficiência desejadas. O dourado (*Salminus brasiliensis*), a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e a piapara (*Leporinus obtusidens*) são espécies de peixes reofílicas e compartilham praticamente o mesmo habitat na América do Sul. A construção de barragens e o desmatamento da mata ciliar são alguns dos fatores descaracterizadores do ambiente aquático natural, e explicam porque, nas últimas décadas, suas populações têm diminuído intensivamente. Nestes estudos, objetivou-se estudar os efeitos do resfriamento e do congelamento sobre os embriões de dourado, piacanjuba e piapara. Foram utilizados embriões de quatro casais de cada espécie, mergulhados em soluções contendo metanol ou dimetilsulfóxido (DMSO) 5, 8 ou 11%, sob resfriamento (-2°C) ou não. Os demais grupos controle foram compostos por embriões não adicionados de crioprotetor e incubados à temperatura ambiente ou resfriados. Outro grupo de embriões foi congelado em N_{2(l)} após banho nas mesmas soluções do resfriamento. Ambos os crioprotetores apresentaram-se pouco tóxicos à temperatura ambiente para os embriões das três espécies. O metanol promoveu as maiores taxas de eclosão médias para os embriões resfriados de dourado e de piacanjuba e com preservação das características morfológicas para esta última independentemente da concentração. Já os embriões de piapara foram muito sensíveis ao resfriamento, exceto quando adicionados de DMSO. A adição de crioprotetores nestes embriões não implicou no aparecimento de lesões durante o resfriamento. Por sua vez, irregularidade entre as camadas de blastômeros e da membrana sincicial do vitelo, além de glóbulos de vitelo dispersos para a periferia do saco vitelínico foram observadas após o resfriamento dos embriões das demais espécies. Três embriões de piacanjuba tratados com metanol 8% e quatro com metanol 11%, além de cinco embriões de piapara também tratados com metanol 11% foram recuperados e incubados após o descongelamento. Deles, dois da primeira e quatro da segunda espécie desenvolveram-se até a formação da placa neural e dos dois primeiros somitos, respectivamente, demonstrando ser possível a preservação de seus embriões de por meio do congelamento rápido. Antes disso, porém, é imprescindível que se aprimore o conhecimento sobre as características biomoleculares destes embriões a fim de se explorar o potencial dos procedimentos aqui utilizados.

Palavras-chave: Criopreservação. Crioprotetores. Dimetilsulfóxido. Metanol. Peixes.

ABSTRACT

The cryopreservation of gametes and embryos of aquatic species offers many benefits to biodiversity conservation, but so far, no protocol was able to obtain viable embryos with the desired efficiency and reproducibility after freezing. Dourado (*Salminus brasiliensis*), piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) and piapara (*Leporinus obtusidens*) are rheophilic fish species and share almost the same habitat in South America. The construction of dams and deforestation of riparian vegetation are some of the factors which alter natural aquatic habitat, and explain why, in recent decades, their populations have declined so intensely. This work aimed at studying the effects of cooling and freezing over dourado, piracanjuba and piapara embryos. Embryos from four pairs of each species were immersed in solutions containing 5%, 8% and 11% of methanol or dimethylsulfoxide (DMSO), maintained under cooling (-2°C) or not. The remaining control groups were composed of embryos without cryoprotectants, incubated at room temperature or cooled. Another group of embryos was frozen in N_{2(l)} after bathing in the same cooling solutions. Both cryoprotectants presented low toxicity at room temperature for the embryos of the three species. Methanol promoted the highest hatching mean rates for dourado and piracanjuba cooled embryos and the preservation of morphological characteristics for the last, regardless of concentration. In turn, piapara embryos were too sensitive to cooling, except when added DMSO. The addition of cryoprotectants to these embryos did not result in the appearance of lesions during cooling. The irregularity between the blastomere layers and yolk syncytial membrane, in addition to yolk globules dispersed to yolk sac periphery, were observed after cooling for the remaining species. Three piracanjuba embryos treated with 8% methanol, four with 11% methanol, and five piapara embryos also treated with 11% methanol were recovered and incubated after thawing. Among these, two of the first specie and four of second have developed until the formation of the neural plate and two-somite stages, respectively, proving possible the preservation of their embryos by fast freezing. However, it is essential to first enhance the knowledge about the biomolecular characteristics of these embryos in order to explore the potential of the procedures used in this work.

Keywords: Cryopreservation. Cryoprotectants. Dimethylsulfoxide. Methanol. Fish.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Exemplar adulto de dourado (<i>Salminus brasiliensis</i>).....	20
Figura 2	Exemplar adulto de piracanjuba (<i>Brycon orbignyanus</i>).....	23
Figura 3	Exemplar adulto de piapara (<i>Leporinus obtusidens</i>).....	25

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Figure 1	Means of (A) hatching rates, (B) diameters, (C) blastoderm and (D) yolk integrities of 90% epiboly <i>Salminus brasiliensis</i> embryos cooled (-2°C / 6 h) or not, submitted or not to cryoprotectants solutions.....	90
Figure 2	Morphological changes verified to <i>Salminus brasiliensis</i> (A, C, D, E and F) and <i>Brycon orbignyanus</i> (B) embryos and larvae after cooling at -2°C / 6 h.....	92
Figure 3	Means of (A) hatching rates, (B) diameters, (C) blastoderm and (D) yolk integrities of 90% epiboly <i>Brycon orbignyanus</i> embryos cooled (-2°C / 6 h) or not, submitted or not to cryoprotectants solutions.....	95
Figure 4	<i>Brycon orbignyanus</i> embryos cryopreserved in N _{2(l)} at -196°C / 7 days.	97

ARTIGO 2

Figure 1	Means of hatching rates of 80% epiboly <i>Leporinus obtusidens</i> embryos cooled (-2 ° C / 6 h) or not, or not to cryoprotectants submitted solutions.....	122
----------	---	-----

Figure 2	Means of embryo diameter of 80% epiboly <i>Leporinus obtusidens</i> embryos cooled (-2 ° C / 6 h) or not, submitted or not to cryoprotectants solutions.....	123
Figure 3	Embryo and larvae of <i>Leporinus obtusidens</i> after cooling at -2 ° C / 6 h.	125
Figure 4	Embryos of <i>Leporinus obtusidens</i> after freezing at -196 ° C / 7 days.	127

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Table 1	Summary of experimental design for cooling and freezing of <i>Salminus brasiliensis</i> and <i>Brycon orbignyana</i> embryos.....	81
Table 2	Hatching rates (HR), diameters (ED), blastoderm (BI) and yolk (YI) integrity of <i>Salminus brasiliensis</i> and <i>Brycon orbignyana</i> embryos used as controls.....	88

ARTIGO 2

Table 1	Summary of experimental design for cooling and freezing of <i>Leporinus obtusidens</i> embryos.....	115
---------	---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

DMSO	dimetilsulfóxido
ACP	agente(s) crioprotetor(es)
PBS	tampão fosfato salino
N _{2(l)}	nitrogênio líquido
AQP3	aquaporina 3
AFP	proteínas anticongelantes
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
PVA	acetato de polivinila
PCR	reação em cadeia da transcriptase
CGP	células germinativas primordiais

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	Dourado (<i>Salminus brasiliensis</i>)	19
2.2	Piracanjuba (<i>Brycon orbignyanus</i>)	22
2.3	Piapara (<i>Leporinus obtusidens</i>)	24
2.4	Aplicações da criopreservação de embriões de peixes	26
2.4.1	Aquicultura	27
2.4.2	Conservação da biodiversidade	28
2.4.3	Outros campos de aplicação	28
2.5	Limitações da criopreservação de embriões de peixes	29
2.5.1	Estrutura complexa e tamanho do embrião	30
2.5.2	Choque térmico e sensibilidade ao resfriamento	32
2.5.3	Choque osmótico e toxicidade dos crioprotetores	35
2.5.4	Alterações no pH	37
2.6	Metodologias de criopreservação de embriões de peixes	38
2.6.1	Resfriamento de embriões	38
2.6.2	Congelamento e vitrificação	40
2.7	Avanços na criopreservação de embriões de peixes	45
2.7.1	Permeabilidade	45
2.7.2	Resistência ao frio	49
2.8	Criopreservação de blastômeros, células-tronco embrionárias e células germinativas primordiais	52
2.9	Criopreservação de embriões de espécies reofílicas brasileiras ...	56
3	OBJETIVO E ESCOPO DA TESE	61
3.1	Objetivo geral	61
3.2	Objetivos específicos	61
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
	REFERÊNCIAS	63
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	75
	ARTIGO 1 Cooling and freezing of embryos of Dourado (<i>Salminus brasiliensis</i>) and Piracanjuba (<i>Brycon orbignyanus</i>), two endangered brazilian teleost fishes	75
1	INTRODUCTION	78

2	MATERIAL AND METHODS	80
2.1	Embryos	80
2.2	Experiment 1: Cold sensibility	83
2.3	Experiment 2: Toxicity of cryoprotectants	83
2.4	Experiment 3: Efficiency of cryoprotectants during cooling	84
2.5	Incubation and hatching	84
2.6	Evaluation of hatching rate and larval viability	84
2.7	Experiment 4: Freezing	85
2.8	Morphometric and morphological analysis of embryos	86
2.9	Statistical analysis	86
2.9.1	Bayesian hierarchical models	86
2.9.2	Preliminary analysis	87
2.9.3	Regression analysis	87
2.9.4	Specific models linking linear predictors and actual responses ...	87
3	RESULTS	88
3.1	<i>Salminus brasiliensis</i>	88
3.1.1	Experiment 1: Cold sensibility	88
3.1.2	Experiment 2: Toxicity of cryoprotectants	88
3.1.3	Experiment 3: Efficiency of cryoprotectants during cooling	89
3.1.4	Experiment 4: Freezing	93
3.2	<i>Brycon orbignyanus</i>	93
3.2.1	Experiment 1: Cold sensibility	93
3.2.2	Experiment 2: Toxicity of cryoprotectants	94
3.2.3	Experiment 3: Efficiency of cryoprotectants during cooling	94
3.2.4	Experiment 4: Freezing	96
4	DISCUSSION	98
	REFERENCES	104
	ARTIGO 2 Cooling and freezing of Piapara (<i>Leporinus obtusidens</i>) embryos	109
1	INTRODUCTION	112
2	MATERIAL AND METHODS	114
2.1	Embryos	114
2.2	Experiment 1: Cold sensibility	117
2.3	Experiment 2: Toxicity of cryoprotectants	117
2.4	Experiment 3: Efficiency of cryoprotectants during cooling	118
2.5	Incubation and hatching	118
2.6	Evaluation of hatching rate and larval viability	118

2.7	Experiment 4: Freezing	119
2.8	Morphometric and morphological analysis of embryos	120
2.9	Statistical analysis	120
2.9.1	Bayesian hierarchical models	120
2.9.2	Preliminary analysis	120
2.9.3	Regression analysis	121
2.9.4	Specific models linking linear predictors and actual responses ...	121
3	RESULTS	122
3.1	Experiment 1: Cold sensibility and toxicity of cryoprotectants ...	122
3.2	Experiment 2: Toxicity of cryoprotectants	123
3.2.1	Experiment 3: Efficiency of cryoprotectants during cooling	124
3.3	Experiment 4: Freezing	126
4	DISCUSSION	128
	REFERENCES	128

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui a mais rica fauna de peixes de água doce do mundo, com mais de 2.500 espécies nativas, e muitas outras ainda desconhecidas (BUCKUP; MENEZES; GHAZZI, 2007). Entre estas espécies, pelo menos 40 têm sido tradicionalmente utilizadas ou apresentam potencial para aquicultura. Fazem parte desta lista várias espécies da família Characidae, entre elas, duas do gênero *Salminus*, incluindo o dourado (*Salminus brasiliensis*) e sete espécies do gênero *Brycon*, incluindo a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Também são citadas espécies da família Anostomidae, todas do gênero *Leporinus*, o que inclui a piapara (*Leporinus obtusidens*) (GODINHO, 2007).

As três espécies citadas necessitam subir à montante dos rios para reproduzir e compartilham praticamente o mesmo habitat na América do Sul, ou seja, as bacias hidrográficas dos rios Paraná, Prata e São Francisco (FROESE; PAULY, 2012). A construção de barragens constitui o principal obstáculo à rota migratória dos peixes de piracema e acaba por reduzir ou eliminar sua eficiência reprodutiva, pois também causa modificação do curso natural dos rios, transformando-os em uma sucessão de lagos artificiais com a perda quase que completa de seu caráter fluvial. Além disso, Godinho (2000) inclui a pesca predatória e a sobrepesca, a captura em períodos de desova, a poluição e o desmatamento da mata ciliar como fatores preponderantes para a descaracterização e o desaparecimento do hábitat aquático natural. Isto explica porque, nas últimas décadas, as populações de peixes de água doce dessas bacias têm diminuído intensivamente. Como exemplo, a piracanjuba foi incluída no livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção (ROSA; LIMA, 2008).

A criopreservação representa, no campo da reprodução animal, uma ferramenta de preservação de germoplasma paterno e materno, a facilitação do transporte de material genético e a preservação de linhagens reprodutivas ameaçadas (DIWAN et al., 2010). Adicionalmente, tecidos reprodutivos, gametas e embriões de peixes também desempenham papel significativo em estudos genômicos humanos (TENA-SEMPERE et al., 2012).

A capacidade técnica de preservação de gametas e embriões de peixes e de invertebrados aquáticos tem se expandido rapidamente nos últimos anos, impulsionada, primariamente, pela indústria aquícola e pela exigência social. Contudo, avanços na pesquisa sobre a criopreservação de ovócitos e embriões são modestos em comparação com o trabalho desenvolvido para espermatozoides, uma vez que o sêmen de mais de 200 espécies de peixes (DIWAN et al., 2010), tem sido congelado ou resfriado com relativo sucesso. Entre estas se incluem espécies migradoras de nossas bacias (MILIORINI et al., 2002, 2011; ÓRFÃO et al., 2011; STREIT JÚNIOR et al., 2009). O sêmen de dourado (VIVEIROS et al., 2009), piracanjuba (GALO et al., 2011; MARIA et al., 2006; MURGAS; FRANCISCATTO; SANTOS, 2003) e piapara (MURGAS et al., 2002; TAITSON; CHAMI; GODINHO, 2008) já foram objeto de estudos de criopreservação, mas a qualidade espermática após o descongelamento para as duas primeiras é ainda muito inferior às das demais.

Os embriões de espécies aquáticas especialmente os peixes, apresentam mais dificuldades que os embriões de mamíferos em termos de criopreservação. Estes são mais sensíveis ao resfriamento e sua estrutura é sobremaneira complexa, com diferentes compartimentos e membranas, além de possuírem dimensões bem superiores às dos mamíferos. Em teoria, ovócitos (GUAN; RAWSON; ZHANG, 2010) e folículos ovarianos (ANIL et al., 2011; TSAI; RAWSON; ZHANG, 2009) de peixes são mais facilmente congeláveis por

possuírem menores dimensões, membranas mais permeáveis e menos complexas.

Segundo Wang et al. (2008), os principais obstáculos à criopreservação de embriões de peixes são: (a) baixa relação superfície/volume, dificultando o fluxo de crioprotetores e de água durante os processos de congelamento/descongelamento; (b) saco vitelínico volumoso e rico em vitelo, com ambiente osmótico particular; (c) sensibilidade acentuada ao frio; e (d) suscetibilidade à cristalização intracelular que, por seu turno, promove a ruptura das membranas celulares. Por isso, resultados positivos na preservação desses embriões tem se resumido a poucos trabalhos (CHEN; TIAN, 2005; ROBLES et al., 2005; ZHANG et al., 1989), porém sem a reprodutibilidade esperada (EDASHIGE et al., 2006).

Apesar da inconsistência, estes resultados são necessários para o fomento de pesquisas futuras sobre criopreservação de embriões das espécies de peixes reofílicas de nossas bacias, sobretudo aquelas com potencial aquícola e com risco maior de extinção.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Dourado (*Salminus brasiliensis*)

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Characiformes

Família: Characidae

Subfamília: Salmininae

Gênero: *Salminus*

Espécie: *Salminus brasiliensis*, Cuvier, 1816

Dependendo da região, o dourado recebe nomes populares distintos, sendo alguns deles: dourado, piraju e pirajuba (indígena), dourado, saipe, saipé e salmo dourado, (Brasil), dorado, harriteta e *jawcharacin* (países de língua inglesa) e damita, dama, picudo, pirayú e tigre de rio (América Latina).

Além disso, três espécies de peixes de água doce são conhecidas vulgarmente pelo nome de dourado. A primeira delas, *Salminus affinis*, habita o norte da Colômbia e parte do Equador, onde é ainda conhecida como dourada ou rubia. A segunda, *Salminus hilarii*, mais conhecida no Brasil como tabarana, é encontrada nos rios São Francisco, Paraná, Tocantins, Amazonas e Orinoco (RODRIGUEZ-OLARTE; TAPHORN, 2006). A última, *Salminus brasiliensis* (Figura 1), inclui os sinônimos *Salminus maxillosus* e *Salminus brevidens*, e é a espécie mais conhecida, habitando a porção sul da América do Sul. Lima e Britski (2007) identificaram uma nova espécie de dourado na bacia do Rio São Francisco, *Salminus franciscanus*, que se distingue das demais por possuir

diferenças anatômicas em relação aos dentes e nadadeira caudal, bem como caracteres merísticos, como número de escamas.

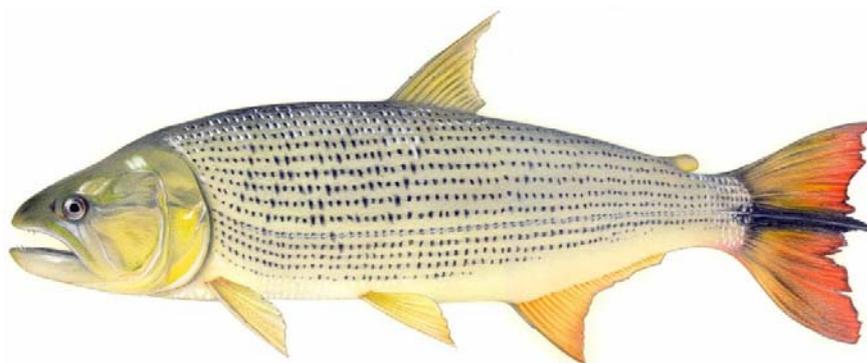


Figura 1 Exemplar adulto de dourado (*Salminus brasiliensis*).

Larvas e juvenis de dourado são reconhecidos como animais carnívoros generalistas, ou seja, predam uma ampla gama de alimentos de origem animal. Neste grupo se destacam além de larvas de peixes de outras espécies, larvas de insetos, microcrustáceos, e organismos do zooplâncton como cladóceros e copépodos, entre outros (RIBEIRO; NUÑER, 2008; RODRIGUEZ-OLARTE; TAPHORN, 2006). Entre as pisciculturas comerciais, o uso de larvas de peixes “forrageiros” para alimentação de larvas de dourado tem se popularizado (SCHUTZ; NUÑER, 2007).

O dourado adulto é uma espécie ictiófaga ou piscívora por excelência e possui cavidade bucofaringeana anatomicamente adaptada à predação. Machos e fêmeas podem atingir até 5 kg e 26 kg, respectivamente (DELLA FLORA et al., 2010) e alcançar até um metro de comprimento (BRITSKI; SILIMON; LOPES, 1999). O dimorfismo sexual não é facilmente visível e é transitório. Somente na época de reprodução, machos apresentam leve enrugamento da nadadeira anal, perceptível ao tato (LIMA; BRITSKI, 2007; RODRIGUEZ-OLARTE; TAPHORN, 2006; WEINGARTNER; ZANIBONI-FILHO, 2005).

O dourado é uma espécie reofilica ou migratória, que necessita percorrer grandes distâncias rio acima para atingir os sítios de reprodução conhecidos como tributários, no fenômeno de migração conhecido popularmente como piracema. Com o início da estação chuvosa e aumento do fotoperíodo e temperatura, o dourado é estimulado para o processo migratório de reprodução. No Sudeste do Brasil, este período corresponde aos meses quentes compreendidos de outubro a março (ESTEVEZ; PINTO-LOBO, 2001; MACHADO, 2005). A desova da espécie é do tipo anual total, possuindo ovos semidensos, e não apresenta cuidado parental (VAZZOLLER, 1996). De acordo com Zaniboni Filho et al. (2000), os exemplares da espécie são solitários durante a maior parte do ano, realizando migrações em direção à montante durante o período reprodutivo, época em que normalmente são encontrados em cardumes.

Atualmente, os centros de pesquisas vêm se interessando pela criação do dourado, por dois motivos: alto potencial para piscicultura, devido a seu alto crescimento inicial e elevado preço de mercado (CRESCÊNCIO, 2005) e pelo desequilíbrio populacional entre diferentes bacias hidrográficas. Morais Filho e Schubart (1955) já mencionavam problemas como a pesca excessiva de dourados jovens na Cachoeira de Emas (Pirassununga-SP), a destruição dos caminhos naturais de migração pelas barragens, as inundações dos tributários de desova pelas represas e o lançamento de resíduos industriais e domésticos. Se tais problemas já preocupavam há mais de meio século, sua intensificação tem resultado na escassez e mesmo extinção do dourado e outras espécies de peixes em algumas localidades (DELLA FLORA et al., 2010; MARQUES, 2002).

2.2 Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Characiformes

Família: Characidae

Subfamília: Bryconinae

Gênero: *Brycon*

Espécie: *Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849

A piracanjuba (Figura 2) é conhecida popularmente como pirá-pitá, piracanjuba, pirápitanga, salmón, salmón-del-Paraná, salmón-del-rio e salmonete (Argentina), piraputá (Uruguai) e piracanjuba, piracanjuva, bracanjuva, bracanjuba, pracanjuva, matrinchã, pirapitonga, piraputanga e salmão-crioulo (Brasil).

Encontra-se distribuída na bacia do Paraná-Uruguai, principalmente nos rios Grande e Paraná (CASTAGNOLLI, 1992). Prefere ambientes lóticos de águas claras, sendo encontrada nos locais em que as árvores se deitam sobre o rio, onde obtém os frutos que lhe servem de alimento.

É onívoro, podendo se alimentar de plantas, pequenos peixes e insetos. Como peixe de grande porte, a fêmea atinge o comprimento de 80 cm e 8,2 kg de peso vivo, enquanto o macho pode alcançar 68 cm e 3,6 kg. Este se reproduz a partir de dois anos de idade, com 20 cm de comprimento, e a fêmea, a partir do terceiro ano, com 25 cm de comprimento (VAZ; TORQUATO; BARBOSA, 2000). Essa espécie é reofilica, assim como todos da subfamília Bryconinae, e sobe os rios entre setembro e outubro para desovar entre novembro e janeiro. A

fecundação é externa e esta espécie também não apresenta cuidado parental da prole (NAKATANI; AGOSTINHO; BAUMGARTNER, 2001).

Santos (1981) relatou que a carne de piracanjuba apresenta, além de convidativo aspecto, finíssimo sabor, podendo rivalizar com os mais saborosos pescados dos rios europeus. De acordo com Murgas, Franciscatto e Santos (2003a) e Vaz, Torquato e Barbosa (2000), esta espécie é apreciada na pesca esportiva, em razão ao comportamento arisco e agressivo, motivo pelo qual tem sido muito procurada para o povoamento de tanque de pesque-pague. Na culinária, destaca-se pelo sabor delicado e aparência róseo-salmão de sua carne.



Figura 2 Exemplar adulto de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*).

As populações de piracanjuba eram especialmente abundantes na bacia do alto Rio Paraná, na calha do Rio Paraná e em seus principais tributários, como o Rio Grande, Tiete e Paranapanema (MACHADO, 2005). No entanto, atualmente é uma das espécies da fauna brasileira em perigo de extinção (ROSA; LIMA, 2008), não sendo mais encontrada em vários trechos do rio Grande, decorrente da construção de um grande número de barragens hidrelétricas, que impedem sua migração reprodutiva, do desmatamento da mata

ciliar, da deterioração da qualidade da água provocada pela poluição industrial e urbana, e da pesca predatória.

2.3 Piapara (*Leporinus obtusidens*)

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Characiformes

Família: Anostomidae

Gênero: *Leporinus*

Espécie: *Leporinus obtusidens*, Valenciennes, 1837

Entre os nomes populares por que a piapara é conhecida, podem-se citar: açu, piaba, piapara, piará, boga e bogón (Argentina), boga e characin (Uruguai) e piapara, piabauçu, piabuçu, piau, piau verdadeiro, piava e piavuçu (Brasil).

O gênero *Leporinus* é o mais diversificado dentro da família Anostomidae, com mais de 60 espécies descritas (HARTZ et al., 2000). De acordo com Godoy (1975), este gênero é encontrado desde a Colômbia até o Uruguai e a Argentina e se distribui geograficamente em todas as bacias hidrográficas brasileiras. A espécie *L. obtusidens* (Figura 3) está distribuída ao longo do sistema hidrográfico do Rio da Prata, e pelas regiões sul e sudeste do Brasil (HARTZ et al., 2000).



Figura 3 Exemplar adulto de piapara (*Leporinus obtusidens*).

A exemplo das demais espécies do gênero *Leporinus*, a piapara possui um hábito alimentar considerado onívoro, alimentando-se de vegetais, insetos, peixes e briozoários (DIAS JÚNIOR; MOURGUÉS-SHURTER, 2001). Como se situa nos elos intermediários da cadeia trófica, é de grande importância na manutenção do equilíbrio do ciclo biológico dos ambientes em que habita, constituindo o principal produto de captura, principalmente no alto rio Paraná (ARAYA; AGOSTINHO; BECHARA, 2005).

São também peixes de piracema, com período de reprodução entre os meses de outubro e fevereiro. Possuem o corpo alongado e fusiforme, apresentam coloração prateada com três manchas pretas nas laterais do corpo e nadadeiras amareladas. Alcançam, em média, 40 cm de comprimento e 1,5 kg, sendo que os indivíduos maiores chegam a 80 cm e 6 kg (CARVALHO, 2004).

Assim como o dourado e a piracanjuba, a piapara possui grande potencial para a aquicultura (BUCKUP; MENEZES; GHAZZI, 2007) e é muito apreciada na pesca esportiva (REYNALTE-TATAJE; ZANIBONI-FILHO, 2005). Assim como para as demais espécies autóctones, sofre substancialmente com a pesca predatória e com as modificações no habitat natural, tais como a construção de barragens e a poluição, justificando a redução da população nas últimas décadas (TAITSON; CHAMI; GODINHO, 2008).

2.4 Aplicações da criopreservação de embriões de peixes

A tecnologia de congelamento de embriões revolucionou a reprodução dos animais domésticos assim como a reprodução humana nas últimas décadas. Camundongos, bovinos, ovinos, equinos, coelhos, mandris, ratos, macacos e suínos já tiveram embriões congelados com sucesso. Até o momento, as taxas de sobrevivência conseguidas para embriões descongelados de mamíferos domésticos em geral permanecem aquém daquelas obtidas com embriões frescos. Contudo o uso de embriões congelados/descongelados poderá, em um futuro próximo, ser incluído na rotina da reprodução comercial como alternativa para algumas espécies, como já o é para humanos, por exemplo.

A criopreservação representa, no campo da reprodução animal, ferramenta de preservação de germoplasma paterno e materno, facilitação do transporte de material genético e de preservação de linhagens reprodutivas ameaçadas (DOBRINSKY, 2002). Além disso, a criopreservação embrionária é essencial para a aplicação de novas biotecnologias tais como a clonagem e a transgenia.

Os embriões de espécies aquáticas, especialmente os peixes, apresentam mais dificuldades que os embriões de mamíferos em termos de criopreservação. Aqueles são mais sensíveis ao resfriamento e sua estrutura é sobremaneira complexa, com diferentes compartimentos e membranas, a fim de se desenvolver no meio externo sem a proteção corporal materna. Avanços na pesquisa sobre a criopreservação de gametas e embriões de organismos aquáticos são modestos em comparação com o trabalho desenvolvido nos mamíferos, principalmente para os embriões, uma vez que o sêmen de mais de 200 espécies de peixes (DIWAN et al., 2010), incluindo o de muitas espécies migradoras, tem sido congelado com sucesso (GALO et al., 2011; MILIORINI et al., 2011; TAITSON; CHAMI; GODINHO, 2008; VIVEIROS; GODINHO,

2009). Por sua vez, o sucesso da preservação de embriões tem se resumido a poucos trabalhos (CHEN; TIAN, 2005; ROBLES et al., 2005), porém sem a reprodutibilidade esperada.

2.4.1 Aquicultura

A criopreservação de embriões representa, em teoria, a melhor opção para a preservação do germoplasma materno e paterno, assim como para a reprodução comercial (MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2008a; ROBLES; CABRITA; HERRAEZ, 2009). A possibilidade da estocagem de embriões por um prazo indeterminado seria muito útil no manejo reprodutivo, afinal, uma das maiores dificuldades na aquicultura é a dependência da sazonalidade da reprodução de cada espécie. Manipulações ambientais e tratamentos hormonais são práticas comuns utilizadas com a finalidade de modificar o ritmo circadiano da reprodução, objetivando a independência dos períodos reprodutivos naturais bem como produtividade homogênea.

A desova é outro evento que impacta o manejo em estações de piscicultura. Como exemplo, a desova do *Scophthalmus maximus*, um peixe marinho comum do Mar Mediterrâneo, ainda não foi obtida em cativeiro. Espécies autóctones de bacias hidrográficas brasileiras, como o dourado (*Salminus brasiliensis*), apesar de desovarem em cativeiro, também não demonstram qualidade e quantidade comparáveis à desova natural. Dessa forma, a criopreservação torna-se essencial para a criação de bancos genéticos que propiciem a estabilização zootécnica e promovam a seleção de programas de melhoramento animal.

2.4.2 Conservação da biodiversidade

A maioria das espécies de peixes das bacias hidrográficas do Brasil está ameaçada. As modificações do ambiente, tais como aquelas referentes à qualidade da água e ao curso dos rios constituem as causas primárias para o problema. A criopreservação de germoplasma é um método seguro para a preservação *ex situ* das espécies ameaçadas e de variedades locais e propicia a reconstituição da população original após a restauração ambiental.

A criopreservação de espermatozoides é mais exequível e muito mais bem sucedida que o congelamento embrionário em peixes dulcícolas ou marinhos (DIWAN et al., 2010). A principal razão para tanto é o fato de que as células espermáticas apresentam um tamanho pequeno, um único compartimento e menos membranas que os embriões. Entretanto, o congelamento de sêmen apenas permite, em termos gerais, a preservação de metade do patrimônio genético, enquanto a criopreservação de embriões pode prover a possibilidade única de preservação genômica e de componentes citoplasmáticos da população original tanto de machos quanto de fêmeas. Segundo Robles et al. (2008), levando-se em conta a proliferação da maioria das espécies aquáticas, mesmo uma taxa de sucesso tão reduzida quanto 1% de larvas viáveis após o congelamento/descongelamento poderia fornecer indivíduos suficientes para recuperar populações estáveis.

2.4.3 Outros campos de aplicação

Outro campo que pode ser beneficiado pela criopreservação de embriões de peixes é a ecotoxicologia (LIU; ZHANG; RAWSON, 2001; ZHANG; LIU; RAWSON, 2003). De acordo com Zhang et al. (2005), os ovócitos e os embriões de peixes representam um interesse particular de testes

ecotoxicológicos devido a sua sensibilidade às alterações das condições ambientais. A padronização do uso de embriões de peixes como biomarcadores requer que eles sejam estáveis e tenham características definidas, e a criopreservação pode promover o suprimento constante deste material biológico para qualquer laboratório em qualquer lugar.

Outra aplicação da biotecnologia são as linhagens criadas por modificações genéticas, como os poliploides e as linhagens transgênicas desenvolvidas para a produção em escala comercial (salmões, por exemplo) ou para pesquisas em biologia molecular, entre outros.

As espécies autóctones brasileiras, em um primeiro momento, serão beneficiadas com o propósito ecológico. No entanto, à medida que a cadeia aquícola avançar e o status ecológico destas espécies forem recuperados, aquelas cujo potencial econômico puder ser explorado, serão motivo de pesquisas em melhoramento zootécnico que, por sua vez, não prescindirá da criopreservação para sua consecução plena.

2.5 Limitações da criopreservação de embriões de peixes

O objetivo da criopreservação é provocar a desidratação celular e a concentração do citosol de maneira controlada a fim de impedir ou, ao menos abrandar, a formação de cristais de gelo (cristalização) durante o congelamento. Nos métodos tradicionais, a maioria das injúrias ocorre durante processo congelamento/descongelamento, no intervalo térmico de 0 até -40°C, e se deve basicamente a dois fatores: à remoção do calor e à aplicação dos crioprotetores. Além destas e da cristalização, Chao e Liao (2001) elencam ainda a variação do pH e o choque osmótico como fatores causadores dos danos celulares durante o congelamento.

2.5.1 Estrutura complexa e tamanho do embrião

Em peixes, assim como em outros pequenos vertebrados, a maior parte do ovócito é rica em vitelo e sofre uma clivagem discoidal parcial após a fertilização. As divisões celulares não dividem completamente o ovo e somente o citoplasma do blastodisco torna-se embrião, enquanto o vitelo permanece indivisível. Os embriões são sistemas biológicos complexos com três diferentes compartimentos: um grande saco vitelínico, um compartimento celular (o embrião em desenvolvimento ou blastoderma em desenvolvimento inicial) e o espaço perivitelínico. O vitelo é envolvido pela membrana sincicial, o embrião em desenvolvimento é limitado por suas próprias membranas plasmáticas e o espaço perivitelínico envolve estes compartimentos que, por sua vez, é limitado pela membrana mais externa, o córion, que deriva da membrana vitelínica do ovócito (RAWSON et al., 2000).

A estrutura particular dos embriões de peixes desfavorece sua criopreservação devido a diferentes peculiaridades sumarizadas por Wang et al. (2008): tamanho relativamente grande e conseqüente baixa relação superfície/volume, dificultando o fluxo de crioprotetores e de água durante os processos de congelamento/descongelamento; saco vitelínico volumoso e rico em vitelo, com ambiente osmótico particular; sensibilidade acentuada ao frio; e susceptibilidade à cristalização intracelular que, por seu turno, promove a ruptura das membranas celulares. Estes compartimentos diferem entre si em permeabilidade, impedindo o fluxo de água e de crioprotetores. Os ovócitos de peixes têm estruturas menos complexas, porém são tão grandes quanto. Apesar disso, um estudo recente (GUAN; RAWSON; ZHANG, 2010) conseguiu, de maneira pioneira, vitrificar com sucesso ovócitos de *Danio rerio*.

Alcançar um balanço apropriado entre água e crioprotetores é uma etapa fundamental no processo de criopreservação e muitos esforços têm sido

despendidos com o intuito de desenvolver metodologias que aumentem a permeabilidade embrionária. O córion, a primeira membrana semipermeável, permite o influxo de água e de outras pequenas moléculas (RAWSON et al., 2000), incluindo alguns crioprotetores como o dimetilsulfóxido (DMSO) e o propilenoglicol (CABRITA et al., 2003a, 2003c). Embriões de *Danio rerio* (ADAMS; ZHANG; RAWSON, 2005), *Scophthalmus maximus* (CABRITA et al., 2003b) e *Prochilodus lineatus* (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2009), entre outros, já foram decorionizados utilizando-se proteases, mas com diferentes graus de resistência coriônica.

As primeiras tentativas de se criopreservarem embriões de peixes foram conduzidas no final da década de 1970 e nos anos de 1980, com salmonídeos (truta arco-íris – *Oncorhynchus mykiss*, truta marrom – *Salmo trutta*, truta de rio – *Salvelinus fontinalis* e salmão do Atlântico – *Oncorhynchus kisutch*) (BILLARD; ZHANG, 2001). Estas espécies têm embriões particularmente grandes (maiores que 1 mm de diâmetro) contendo um amplo saco vitelínico. As dimensões embrionárias determinam a razão superfície/volume, que possui uma relação inversa com o tamanho do embrião. A redução na razão superfície/volume resulta em um decréscimo no influxo de crioprotetores e no efluxo de água, dificultando o processo de desidratação, independentemente da permeabilidade das membranas embrionárias.

Os resultados obtidos com aqueles primeiros estudos desestimularam a continuação das pesquisas, e espécies com embriões menores tornaram-se objeto dos ensaios desde então. O *Danio rerio* é uma espécie de peixe de água doce modelo em estudos de reprodução. Seus embriões têm menos de 1 mm de diâmetro e são, provavelmente, os mais utilizados nos experimentos criobiológicos (ADAMS; ZHANG; RAWSON, 2005; CARDONA-COSTA; FRANCISCO-SIMAO; GARCIA-XIMENEZ, 2009; EL-BATTAWY; LINHART, 2009; GUAN; RAWSON; ZHANG, 2010; HIGAKI et al., 2009,

2010; JANIK; KLEINHANS; HAGEDORN, 2000; LAHNSTEINER, 2008; LI et al., 2009; LIU; ZHANG; RAWSON, 2001; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2008b, 2009; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2009; ROBLES et al., 2004; SILAKES; BART, 2010; WANG et al., 2008; ZHANG; LIU; RAWSON, 2003), seguido do *Oryzias latipes* (ROUTRAY et al., 2002; STRUSSMANN et al., 1999; VALDEZ et al., 2005). Entre as espécies marinhas com embriões também pequenos citam-se *Scophthalmus maximus* (CABRITA et al., 2003a, 2003b, 2003c; ROBLES et al., 2003, 2004, 2006), *Sparus aurata* (BEIRÃO et al., 2006; CABRITA et al., 2006; ROBLES et al., 2007), *Paralichthys olivaceus* (CHEN; TIAN, 2005; EDASHIGE et al., 2006; ZHANG et al., 2005) e *Pseudopleuronectes americanus* (CABRITA et al., 2003a; ROBLES et al., 2005).

Os embriões das espécies de peixes autóctones das bacias do Brasil possuem dimensões ainda maiores, o que justifica a escassez de trabalhos que versem sobre o assunto. A espécie-modelo no estudo reprodutivo nas Américas têm sido a curimba ou curimbatá, *Prochilodus lineatus* (MILIORINI et al., 2011), e seu diâmetro médio correspondeu a cerca de 3 mm na fase de gástrula com 90% de epibolia (NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006). Como outro exemplo, o diâmetro médio do ovo recém-fertilizado de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, oscilou entre 1,25 e 2,69 mm (TOMIITA; GONÇALVES; VIEGAS, 2008).

2.5.2 Choque térmico e sensibilidade ao resfriamento

Um dos fatores que limita a criopreservação é a sensibilidade elevada ao frio. O choque térmico é provocado pela mudança, nas membranas lipídicas, da fase líquida para a fase sólida durante o processo de congelamento, entre 10 e -168°C (CHAO; LIAO, 2001). A baixa temperatura, isoladamente, não é

suficiente para promover esta alteração. Naquela faixa de temperatura, a cristalização ocorre espontaneamente, proporcionando a desidratação dos lipídios e induzindo a transformação do líquido lamelar para a fase de transição. Isto provoca aumento na tensão da membrana e resulta no assim denominado choque térmico.

O congelamento, comumente empregado na criopreservação de material biológico, requer o resfriamento progressivo e transposição rápida pela zona de temperatura em que ocorre cristalização. Esta sensibilidade é peculiar para cada espécie e para cada tipo de célula e tem sido analisada em *Danio rerio* (LAHNSTEINER, 2008; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2009; ZHANG; LIU; RAWSON, 2003), em *Brachydanio frankei* (ROUTRAY et al., 2010), *Tinca tinca* (EL-BATTAWY; LINHART, 2009), *Oryzias latipes* (VALDEZ et al., 2005) e em experimentos de preservação em curto prazo de espécies reofilicas de bacias brasileiras (LOPES et al., 2011; PEREIRA, 2010; STREIT JÚNIOR et al., 2007). Em todas elas, uma sensibilidade marcante à refrigeração foi observada nos estágios mais precoces de desenvolvimento, enquanto aquelas fases mais tardias se mostraram mais tolerantes. A sensibilidade ao frio não se restringe somente aos embriões de peixes, mas aos ovócitos também, cuja criopreservação é de difícil consecução tal qual a de embriões (GUAN; RAWSON; ZHANG, 2010).

A sensibilidade acentuada a baixas temperaturas tem sido, há muito, atribuída à inibição de enzimas e processos metabólicos, deletéria ao desenvolvimento particularmente rápido dos embriões de peixes (DINNYÉS et al., 1998). Os embriões de *Oryzias latipes* exibiram menor sensibilidade que outras espécies, sendo que a taxa de sobrevivência daqueles embriões entre duas e quatro células foi afetada somente após dois minutos de resfriamento a 0°C, enquanto a taxa de eclosão não diminuiu para os embriões em fase de gastrulação preservados entre 0 e 5°C. Outras espécies mais sensíveis também

demonstraram um aumento similar na tolerância ao frio durante o desenvolvimento. Em geral, considera-se até hoje que os estágios em redor de 50% de epibolia são menos sensíveis ao resfriamento (ZHANG; LIU; RAWSON, 2003), o que sugere que aquelas fases mais tardias sejam mais apropriadas à criopreservação.

A tolerância a temperaturas próximas a 0°C por um determinado período pode ser útil para o retardamento do desenvolvimento embrionário e para a estabilização dos protocolos de preservação em curto prazo. Foi com este objetivo que Pereira (2010) verificou que os embriões de *Prochilodus lineatus* imersos em soluções de metanol e DMSO apresentaram taxas de eclosão próximas de 75% quando mantidos por até 4 horas a 4°C. Aumentando-se o tempo de resfriamento para 6 horas, a taxa de eclosão diminuiu para cerca de 50% que, após 8 horas de resfriamento, reduziu-se ainda mais.

A adição de metanol ou glicerol ao meio de incubação aumentou a sobrevivência dos embriões de *Danio rerio* após o resfriamento (ZHANG; LIU; RAWSON, 2003). Quando expostos a 0°C por 18 a 24 horas em metanol 1 M ou 0,1 M de sacarose, a porcentagem de sobrevivência foi de 88% e 82%, respectivamente. Os mesmos crioprotetores foram utilizados combinados (sacarose 0,5 M e metanol 9%) por Streit Júnior et al. (2007), no resfriamento a -8°C por 6 horas de *Piaractus mesopotamicus*. Entretanto, os autores não observaram diferença significativa na eclodibilidade média entre o grupo controle (80%) e o tratamento citado (69,2%).

Em um protocolo de congelamento, espera-se um efeito benéfico das soluções crioprotetoras para superar as injúrias que a redução da temperatura promove. Contudo, há de se ressaltar que os efeitos deletérios são acentuados rapidamente em temperaturas abaixo de 0°C e, em todas as espécies analisadas, os embriões morreram em temperatura próxima a -30°C, tornando a aplicação de

protocolos de congelamento lento impraticáveis para embriões de peixes (ROBLES et al., 2008).

2.5.3 Choque osmótico e toxicidade dos crioprotetores

A utilização de agentes crioprotetores (ACP) tem por objetivos principais evitar a cristalização e proporcionar um ambiente osmótico favorável. No entanto, a utilização de concentrações inapropriadas promove aumento da concentração osmótica dentro do embrião e das células, com consequente influxo de água. Como o embrião e as células já estão aumentados de volume em decorrência da cristalização, as membranas como um todo sofrem fraturas em vários pontos, susceptibilizando-as a rupturas letais.

Como se pode concluir, a utilização de ACP é imprescindível para qualquer protocolo de criopreservação. Não obstante, antes de qualquer tentativa de criopreservação, é necessário conhecer o efeito tóxico sobre a espécie em estudo. Os embriões de peixes são também muito sensíveis às substâncias utilizadas tradicionalmente. Sua toxicidade aumenta com o tempo de exposição, temperatura e concentração do agente, além de ser espécie-específica em relação ao estágio de desenvolvimento.

Embriões de invertebrados marinhos e de crustáceos ontogenicamente mais desenvolvidos exibem uma maior resistência aos ACP (ROBLES et al., 2008). Entre os peixes estudados até o momento, entretanto, existe uma variação no grau de toxicidade em relação à natureza e à concentração de cada ACP testado. Os crioprotetores mais comumente empregados são o DMSO, o metanol, o glicerol, o propanodiol, o etilenoglicol e o propilenoglicol, em concentrações que variam entre 1 M e 2 M para espécies com embriões pequenos (BILLARD; ZHANG, 2001). Quando comparado com outros ACP, como o etilenoglicol, o DMSO foi melhor tolerado pelos embriões de

Scophthalmus maximus (CABRITA et al., 2003c) enquanto, contrariamente, embriões de *Sparus aurata* foram mais resistentes ao etilenoglicol que ao DMSO e ao metanol (CABRITA et al., 2006). Os embriões de *Danio rerio* também toleraram melhor o DMSO, seguido de 1,2-propanodiol e glicerol, em relação aos demais ACP testados, como etilenoglicol, metanol e N,N-dimetilacetamida (LAHNSTEINER, 2008).

No estudo feito por Lahnsteiner (2008), os ACP externos (glicose e sacarose) se mostraram menos tóxicos que os internos, como esperado. Além destes, a geleia real também tem sido utilizada como crioprotetor externo, embora com resultados apenas discretos (STREIT JÚNIOR et al., 2007). A principal propriedade positiva dos crioprotetores externos é a estabilidade da membrana celular, especialmente no que se refere à deformação mecânica provocada por efluxo de água e influxo de crioprotetor intracelular. Este fato é evidenciado pela necessidade da manutenção estrutural e funcional da camada fosfolipídica, quando a estrutura está sendo exposta a uma nova temperatura.

A toxicidade do ACP também está diretamente relacionada à fase do desenvolvimento do embrião. Em geral, aqueles embriões mais jovens, menos desenvolvidos, apresentam-se menos tolerantes ao crioprotetor. Dessa forma, embriões de *Danio rerio*, nas fases de blástula e gástrula, exibiram intensa sensibilidade a todos os crioprotetores investigados (HIGAKI et al., 2009), assim como aos ACP externos (LAHNSTEINER, 2008). Surpreendentemente, não houve diferença significativa entre as quatro fases estudadas por Rahman et al. (2008) – gástrula, somitos, alongamento da cauda e pré-eclosão – quanto à toxicidade, exceto por uma discreta intolerância dos embriões em pré-eclosão.

Já para os embriões de *Tinca tinca* (EL-BATTAWY; LINHART, 2009), o estágio mais lábil e o mais resistente ao frio foram, respectivamente, o mais precoce (11 h) e o mais tardio (29 h), sendo o mesmo verificado para os ensaios de criotoxicidade ao metanol e ao glicerol 10 e 20%. Para espécies como

Pagellus bogaraveo, *Carassius auratus* e *Sciaenops ocellatus*, os estágios mais tardios são mais sensíveis ao resfriamento que estágios precoces. Como demonstraram os trabalhos citados anteriormente, outras espécies têm seus estágios embrionários tardios mais resistentes. Incluem-se, entre elas, ainda, *Oncorhynchus mykiss*, *Pimephales promelas* e *Paralichthys olivaceus*.

O efeito tóxico de ACP, como o DMSO, não se restringe somente aos embriões, mas também a células-tronco embrionárias de peixes, cuja criopreservação restringe a aplicação da técnica, com finalidades terapêuticas, sobre este tipo de célula. Sendo assim, estudos vêm sendo conduzidos reduzindo-se a concentração compensada pela inclusão de ACP não tóxicos àquelas células, tanto que, a combinação de DMSO e trealose favoreceu a sobrevivência e a recuperação de células-tronco de *Labeo rohita* em relação ao uso isolado do primeiro agente (DASH et al., 2008).

2.5.4 Alterações no pH

Segundo Chao e Liao (2001), a maioria dos sais biológicos são eutéticos entre 0°C e -55°C, ou seja, formam soluções com outros solutos, cujo ponto de fusão final torna-se o mais baixo possível, e todos seus constituintes cristalizam simultaneamente naquela faixa de temperatura. Durante o congelamento e o descongelamento, a função de tamponamento destes sais é desfeita e o pH das soluções biológicas se altera. A variação de pH causada pelo congelamento ou a adição de crioprotetores pode resultar em crioinjúrias temporárias ou definitivas.

É por isso que as pesquisas em criopreservação primam pelo tamponamento prévio das soluções crioprotetoras como forma de eliminar a interferência exógena e isolar o efeito do ACP que se estuda. Entre os meios tamponantes, o tampão fosfato salino, ou PBS, é o mais utilizado (KOPEIKA et al., 2005; MAKAREVICH et al., 2010), ao lado da solução salina de Hank

(CARDONA-COSTA; GARCIA-XIMENEZ, 2007; DING; XIAO; LI, 2007; ROUTRAY et al., 2010).

2.6 Metodologias de criopreservação de embriões de peixes

A preservação de embriões pode ser realizada por meio de diversas técnicas, destacando-se o resfriamento, o congelamento lento, o congelamento rápido e a vitrificação.

2.6.1 Resfriamento de embriões

Entre as técnicas de criopreservação de embriões, o resfriamento é, sem dúvida, aquela com melhores resultados. Na busca por respostas, estudos têm utilizado a técnica envolvendo temperaturas próximas ao ponto de congelamento da água como alternativa para observar os danos causados aos embriões quando expostos ao frio, assim como para buscar informações que auxiliem a elucidar os entraves ao congelamento e à vitrificação embrionários (AHAMMAD; BHATTACHARYYA; JANA, 2003; PEREIRA, 2010; STREIT JÚNIOR et al., 2007). A limitação da metodologia é, obviamente, o curto período de tempo de viabilidade embrionária, além da execução mais laboriosa.

Assim, embriões de *Cyprinus carpio* foram resfriados com o intuito de se avaliarem diferentes concentrações de sacarose e metanol, durante 72 horas de resfriamento a 4°C ou -2°C. O curioso é que Ahammad, Bhattacharyya e Jana (2003) verificaram que as amostras contendo embriões mantidos com a solução de sacarose 0,5 M, sem crioprotetor interno, apresentaram as maiores taxas médias de eclosão (41% após 12 h e 11% após 72 h), diferentemente do verificado por Pereira (2010). Este autor resfriou embriões de *Prochilodus lineatus* testando a combinação de metanol ou DMSO, em concentrações que

variaram de 5,0 a 12,5%, com sacarose 0,5 M. Os embriões foram mantidos em refrigerador a 4°C por 2 h, 4 h, 6 h ou 8 h. O tempo de resfriamento promoveu uma redução na taxa de eclosão, independentemente da concentração da solução crioprotetora, embora as soluções contendo metanol tivessem proporcionado porcentagem média de larvas viáveis superior em relação àquelas mantidas com DMSO; mais que isto, a adição de ambos os ACP proporcionou a eclosão de um número de larvas maior inclusive que as do grupo controle.

Embora não tenham congelado os embriões de *Piaractus mesopotamicus*, como fizeram Fornari et al. (2010) e Streit Júnior et al. (2007) resfriaram-nos por seis horas a uma temperatura de -8°C. Para tanto, os pesquisadores utilizaram geleia real como crioprotetor externo, além de glicose. Os crioprotetores internos testados foram metanol e etilenoglicol, e o método adotado para o resfriamento lento dos embriões foi o mesmo utilizado por Ahammad, Bhattacharyya e Jana (2003). Com exceção dos tubos do grupo controle, aqueles contendo os embriões imersos nas soluções crioprotetoras foram resfriados em recipiente contendo água a 15°C, durante 10 minutos. Em seguida, os tubos foram transferidos para outro recipiente com água a 5°C, durante o mesmo período de tempo, para posterior acondicionamento em congelador a -8°C por seis horas. Em seguida, os tubos foram retirados, as soluções contidas em seu interior foram drenadas e os embriões transferidos para incubadoras de 7 L, onde já se encontrava o grupo controle. Protocolo semelhante foi adotado por Lopes et al. (2011) para os embriões da mesma espécie, mas o objetivo foi avaliar a melhor fase de desenvolvimento em que o resfriamento fosse menos deletério.

De modo geral, nas soluções em que foi utilizado o metanol como crioprotetor intracelular, a taxa de eclosão foi superior àquela em que o crioprotetor intracelular foi o etilenoglicol, especialmente quando a sacarose foi acrescentada à solução crioprotetora. A não ocorrência de eclosão nos

tratamentos com etilenoglicol pode estar relacionada à interferência deste crioprotetor no metabolismo do embrião, provocando desestruturação celular e, conseqüentemente, morte. De acordo com Kusuda, Teranishi e Koide (2002), as lesões nos embriões, durante o resfriamento, ocorrem em virtude da degeneração das células e das proteínas da membrana nuclear, e também da desidratação e do aumento na concentração salina decorrentes do contato com o crioprotetor. A substituição parcial da sacarose por outro crioprotetor extracelular, no caso a glicose, associada ao metanol e ao etilenoglicol, foi ineficiente para o resfriamento de embriões de *Piaractus mesopotamicus*, como se verificou na baixa taxa de eclosão observada (18,2 e 0%, respectivamente) (STREIT JÚNIOR et al., 2007). Este fato fica evidenciado se comparado com a taxa de eclosão no tratamento em que se utilizou apenas a sacarose como agente crioprotetor extracelular. A eficiência da sacarose como crioprotetor extracelular em relação à glicose, neste trabalho, pode estar relacionada ao fato de a sacarose, que é um oligossacarídeo, ter um efeito adicional de proteção celular sobre outros açúcares de cadeia mais simples, como a glicose, por provocar desidratação nos embriões, evitando a formação de cristais de gelo intracelular. Um dos resultados mais relevantes obtidos neste experimento é o fato de a geleia real não ter sido eficiente em reduzir os danos provocados pelo frio. A taxa de eclosão do tratamento com 1% de geleia real associada ao metanol e à sacarose foi menor do que a taxa observada no tratamento sem a substância na solução crioprotetora.

2.6.2 Congelamento e vitrificação

O que difere basicamente o congelamento lento, o congelamento rápido e a vitrificação são as velocidades (taxas) com que a temperatura decresce, o número de etapas de incubação dos embriões com os ACP e a concentração

destes últimos. Todos os protocolos de criopreservação culminam com a estocagem em nitrogênio líquido ($N_{2(l)}$) a $-196^{\circ}C$, mas variam em relação às taxas de congelamento que podem ser lineares ou complexas.

Os protocolos diferem ainda no equipamento que produz tais taxas, variando desde caixas de poliestireno (DING; XIAO; LI, 2007; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2009), biocongeladores e botijões de vapor de nitrogênio. Os protocolos tradicionais de criopreservação que fazem uso de congeladores programáveis, também chamados de biocongeladores, proporcionam reduções mais lentas da temperatura e permitem controlar a formação de cristais de gelo com grande precisão. Estes equipamentos, assim como o utilizado por Ninhaus-Silveira et al. (2007) na preservação de embriões de *Prochilodus lineatus*, oferecem uma segurança e uma facilidade no controle da taxa de congelamento improvável com as caixas térmicas. Todos estes métodos têm provado ser adequados para a preservação de sêmen (CHAO; LIAO, 2001), entretanto, mesmo com a precisão característica, nem sempre são apropriados para impedir a cristalização nos diferentes compartimentos que possuem os embriões de peixes.

Durante o processo, objetiva-se que as células se desidratem e incorporem os crioprotetores. Segundo Billard e Zhang (2001), embriões de peixes desprotegidos não sobrevivem em temperaturas menores que $-35^{\circ}C$. As únicas referências na última década que conseguiram recuperar larvas provenientes de embriões de peixes criopreservados são o trabalho de Chen e Tian (2005) e Robles et al. (2005). Estes últimos autores obtiveram, entre cinco experimentos realizados e 292 embriões de *Paralichthys olivaceus* vitrificados, vinte embriões que sobreviveram ao processo, dos quais 14 eclodiram e se desenvolveram em larvas morfológicamente normais. No entanto, Edashige et al. (2006) tentaram, sem sucesso, reproduzir o experimento com a mesma espécie e concluíram que o protocolo de vitrificação é ainda inadequado para a

aplicação na piscicultura. Antes destes trabalhos, somente um estudo com *C. carpio*, no final da década de 1980, havia relatado a recuperação de embriões viáveis após o congelamento lento (ZHANG et al., 1989), mas também, sem reprodutibilidade desde então.

Hagedorn et al. (2004) concluíram que a cristalização intracelular ocorre naturalmente em temperaturas relativamente altas, próximas a 0°C, independentemente da presença de ACP na solução congelante. Isto se deve, segundo eles, ao apenas moderado grau de desidratação que sofrem os embriões de peixes, permitindo o crescimento dos cristais dentro dos compartimentos e ocasionando sérias injúrias às membranas; as elevadas taxas de congelamento e as altas concentrações de ACP empregadas na vitrificação visam sobrepujar ao máximo tais limitações.

A vitrificação implica na transformação de uma solução aquosa em um sólido amorfo de aspecto vítreo sem a cristalização, em decorrência de um aumento drástico na viscosidade durante um congelamento ultrarrápido. A solução vitrificante, em teoria, solidifica-se sem haver cristalização durante o congelamento e impede a recristalização durante o descongelamento. Isto é conseguido mediante a utilização de altas concentrações de ACP e compostos de alta densidade na solução. Como explanado anteriormente, concentrações elevadas de ACP aumentam a toxicidade destes agentes sobre os embriões, mas a combinação de diferentes crioprotetores objetiva mitigar o efeito tóxico individual sem diminuir a osmolaridade da solução.

Enquanto somente três trabalhos obtiveram larvas a partir de embriões descongelados, outros têm conseguido recuperar embriões descongelados que, embora não se desenvolveram em larvas, tiveram sua integridade morfológica preservada. Como exemplo, Liu, Zhang e Rawson (1998) reportaram 80% de embriões de *Danio rerio* morfológicamente normais após a criopreservação com metanol 10 M. Robles et al. (2003), por sua vez, verificaram 49% dos embriões

de *Scophthalmus maximus* íntegros após o congelamento. Estes embriões foram submetidos a uma combinação de ACP internos e externos em várias etapas, que diferiam na concentração do(s) crioprotetor (es) e na temperatura de incubação. O mesmo protocolo foi adotado por Cabrita et al. (2006) para os embriões de *Sparus aurata*, entretanto, a avaliação da integridade morfológica revelou que a grande maioria dos embriões estava inviável.

Os trabalhos anteriores utilizaram a microscopia de luz como meio de avaliação da morfologia embrionária, mas existem outros métodos de diagnóstico. Entre eles, cita-se a determinação da atividade de enzimas citoplasmáticas, realizada por Robles et al. (2004). Os autores testaram o efeito da criopreservação sobre a viabilidade dos embriões de *Danio rerio* e *Scophthalmus maximus* submetidos ou não à vitrificação em relação ao grupo não submetido ao frio sem contato com ACP. O estudo revelou que, apesar da perda de habilidade em se desenvolverem, os embriões descongelados manifestaram alguma atividade celular. Cerca de 50% da atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, enzima fundamental ao metabolismo energético, foi preservada nos embriões de *Scophthalmus maximus* com 5 somitos, indicando que não houve lise total das células. O decréscimo da atividade enzimática foi mais intenso nos embriões de *Danio rerio*, sugerindo uma lise celular também intensa e uma maior sensibilidade das membranas da espécie ante a vitrificação.

Outros estudos têm estimado a porcentagem de células embrionárias dissociadas dos blastômeros dos embriões criopreservados e avaliando a viabilidade celular com provas fluorescentes. Martínez-Páramo et al. (2009) verificaram entre 25% e 50% de células viáveis após a vitrificação de embriões de *Danio rerio* no estágio de blástula. Estas taxas de sobrevivência celular indicam a criopreservação apropriada de algumas células, embora seja considerada incompatível com o desenvolvimento embrionário a termo.

Entre as principais limitações da vitrificação, a principal poderia ser o pequeno influxo de ACP nos compartimentos embrionários. As soluções utilizadas no processo são vitrificáveis, mas a concentração final em um ou mais compartimentos pode ser insuficiente para proteger o embrião. De fato, Robles et al. (2003) observaram recristalização dentro do saco vitelínico, caracterizada pelo branqueamento do embrião durante o descongelamento. A vitrificação deveria evitar a formação de cristais de gelo dentro do embrião; contudo, o que se percebe nos experimentos com peixes é a ocorrência de recristalização durante o descongelamento tanto no congelamento lento como na vitrificação.

Enquanto o congelamento lento é o preferido para a preservação de células-tronco de peixes, por provocar menos lesões que o congelamento rápido e a vitrificação (DASH et al., 2008), a maioria dos autores, entre eles Silakes e Bart (2010) e Vajta e Kuwayama (2006), considera que a biotecnologia mais promissora para preservação em longo prazo de embriões de peixes seja a vitrificação. Há, contudo, pesquisadores menos otimistas em relação à eficiência da vitrificação. Assim, Lahnsteiner (2008) verificou que a espessura do espaço perivitelínico dos embriões de *Danio rerio* apresentou alterações morfométricas significativas devido à exposição aos ACP, sem haver modificações no tecido germinativo. O vitelo não sofreu qualquer tipo de alteração morfométrica após a exposição aos ACP internos e nenhum sinal de desidratação foi observado. O autor concluiu então que protocolos de congelamento lento devem ser a melhor opção para a preservação de embriões de *Danio rerio*, uma vez que não houve desidratação e os ACP internos ainda assim exibiram significativa toxicidade. Desta maneira, os crioprotetores, em baixas concentrações, provocariam menor toxicidade aos embriões.

2.7 Avanços na criopreservação de embriões de peixes

Entre os aspectos que obstam o sucesso dos protocolos de criopreservação, a permeabilidade das membranas embrionárias e a resistência ao frio têm sido alvo das principais pesquisas. Sendo assim, apesar dos resultados ainda incipientes, o conhecimento agregado sobre estas propriedades já revela alguns avanços e alternativas.

2.7.1 Permeabilidade

A criopreservação de embriões de peixes é uma área controversa em função da carência de respostas, mas, como subentendido anteriormente, a tênue permeabilidade à água e aos ACP é considerada o obstáculo preponderante ao sucesso das metodologias. A permeabilidade dos embriões à água difere entre as espécies para cada fase do desenvolvimento embrionário, e ainda é alterada pela presença de ACP. A mesma dificuldade em se permear os embriões é peculiar aos ovócitos de peixes, cuja permeabilidade à água e aos ACP é, juntamente com a sensibilidade ao frio, o maior obstáculo à sua criopreservação (GUAN et al., 2010).

A complexidade dos embriões de peixes requer, portanto, técnicas adicionais e mais sofisticadas de mensuração das variações de permeabilidade. As técnicas convencionais de mensuração da permeabilidade das membranas embrionárias são demoradas e reduzem a capacidade de análise de vários embriões durante a execução de um experimento (ZHANG et al., 2006). Estes autores utilizaram a espectroscopia de impedância para mensurar a permeabilidade dos embriões de *Danio rerio*, e identificaram as frequências de 10 ou 1380 Hz como aquelas que provêm melhor sensibilidade e reprodutibilidade. O mais expressivo é que significativas impedâncias foram

detectadas após a exposição aos crioprotetores, indicando ser a técnica compatível com as tradicionalmente utilizadas para ensaios de mensuração volumétrica.

A consecução de protocolos de criopreservação bem-sucedidos demanda não somente que a água livre seja removida o máximo possível do interior do embrião, mas também que o ACP esteja difundido por todos os seus compartimentos, em concentrações suficientes para conferir proteção. Dessa forma, muitos pesquisadores têm tentado identificar a barreira primária à penetração de crioprotetores no embrião. Tratamentos com bicarbonato de sódio e hipoclorito de cálcio, bem como digestão com proteases, tais como a pronase E, têm sido utilizados para elevar a permeabilidade do córion, porém nenhum influxo significativo de DMSO foi observado nos embriões de *Scophthalmus maximus* (CABRITA et al., 2003c). Pelo contrário, esses tratamentos de permeabilização revelaram um rápido efluxo de DMSO quando os embriões foram lavados para a remoção do crioprotetor, indicando que os métodos de permeabilização coriônica (ou decorionização, se possível) poderiam exigir algumas etapas dentro de um protocolo de criopreservação (CABRITA et al., 2003a), mesmo que crioprotetores internos fossem empregados. Os mesmos autores utilizaram cromatografia líquida de alto desempenho e DMSO-³H e observaram que o crioprotetor penetrou o espaço perivitelínico e alguns tecidos, mas a concentração final foi ínfima e não protegeu o embrião contra injúrias. Na opinião de Janik, Kleinhans e Hagedorn (2000), nem o blastoderma nem o vitelo ou o córion são as principais barreiras aos ACP, concluindo ser a membrana sincicial do vitelo o obstáculo predominante.

Apesar das diferentes alternativas para se aumentar a permeabilidade embrionária, nenhuma delas foi capaz de elucidar definitivamente o processo, embora se reconheçam avanços. Alguns estudos têm testado técnicas de introdução de ACP como o ultrassom, a eletroporação e a microinjeção. Wang et

al. (2008) observaram um aumento da permeabilidade coriônica dos embriões de *Danio rerio* em voltagens de 50 a 175 V sob baixa frequência (10 Hz), indicando um influxo maior de metanol em relação ao grupo não submetido a ultrassom. O mesmo resultado foi observado por Silakes e Bart (2010). Estes autores expuseram três tipos de embriões de *Danio rerio* com 90% de epibolia (totalmente decorionizados, parcialmente decorionizados e intactos) a níveis crescentes (20%, 30% e 40%) de metanol, submetidos ou não ao ultrassom. O ultrassom claramente favoreceu o influxo de metanol, significativamente maior nos embriões decorionizados e, mesmo naqueles embriões parcialmente decorionizados, a concentração intracelular do crioprotetor foi elevada. Em contrapartida, o ultrassom diminuiu a sobrevivência embrionária, embora, segundo os autores, a taxa média de sobrevivência tenha sido relativamente alta ($64 \pm 2\%$). Silakes e Bart (2010) concluíram, finalmente, que, ainda que a maior concentração de metanol para o melhor tratamento tenha sido superior a 85%, esta é, na opinião dos autores, muito inferior à necessária à vitrificação.

Já a microinjeção foi a técnica escolhida por Beirão et al. (2006) para introduzir ACP's no interior do saco vitelínico de embriões de *S. aurata*. Os crioprotetores empregados foram DMSO, metanol e etilenoglicol (5 M, 10 M e 100%) ou sacarose (10% e 15%). Em um segundo experimento, os pesquisadores avaliaram a sensibilidade ao congelamento lento ($-10^{\circ}\text{C}/30 \text{ min.}$) ao injetarem 29,5 μL de DMSO 100% ou 15% de sacarose dentro do saco vitelínico de embriões decorionizados em início de desprendimento de cauda, e metanol 3 M na fase mais tardia, de cauda livre. Os resultados demonstraram que a microinjeção não afetou a viabilidade dos embriões menos desenvolvidos, evidenciando alta taxa de eclosão e sobrevivência. Mesmo a taxa de sobrevivência larval após a absorção do saco vitelínico não foi afetada pelos ACP's testados, superando 90% com uma menor concentração de crioprotetor. Concentrações de crioprotetor dentro do saco vitelínico superiores a 1,18 M para

o DMSO, 1,5 M para o etilenoglicol e 2,0 M para o metanol foram, contudo, tóxicas aos embriões. Estes resultados evidenciam que a técnica é útil principalmente para se controlarem a exata concentração intraembrionária de ACP que promova proteção sem causar toxicidade.

Hagedorn et al. (2002) propuseram uma solução original para superar os entraves com permeabilidade das membranas dos embriões de peixes. Eles injetaram RNAm para a molécula de Aquaporina 3 (AQP3), uma proteína integral que conduz seletivamente as moléculas de água e glicerol, para dentro e para fora da célula, ao mesmo tempo prevenindo a passagem de íons e outros solutos hidratados. Os embriões de *Danio rerio* que expressaram a AQP3 tiveram a permeabilidade à água sextuplicada, e a permeabilidade ao propilenoglicol 2,5 vezes maior que a do grupo controle. Lance, Peterson e Hagedorn (2004) demonstraram a expressão da AQP3 em redor das células nas primeiras 24 h, diminuindo após 96 h sem afetar a sobrevivência embrionária. Como a expressão da AQP3 diminuiu somente após 4 dias após a transfecção, a técnica pode ser entendida como um meio reversível e confiável de se introduzirem moléculas protetoras nos embriões.

A habilidade de se introduzir, remover e modificar moléculas no ambiente intracelular é o sustentáculo ao entendimento da estrutura e de sua função. Segundo Kohli et al. (2007), a manipulação não invasiva de sistemas multicelulares é importante para a pesquisa médica e biológica, pois evita a interferência dos métodos sobre os resultados. Pensando assim, os pesquisadores utilizaram um método de introdução de material exógeno utilizando-se pulsos de femtossegundos (10^{-15} segundos) a laser. Quando tais pulsos são frequentes e direcionados sobre locais de dimensões menores que o micron, poros transitórios são formados, fornecendo um caminho através do qual partículas podem ser introduzidas nas células embrionárias. Embriões de *Danio rerio* intactos e decorionizados foram marcados com isotiocianato de fluoresceína e submetidos

a pulsos a laser. A formação de poros ocorreu tanto na interface blastômero-vitelo quanto nos blastômeros. A sobrevivência em longo prazo dos embriões em estágio de nadadeira peitoral foi de 89%, para os embriões decorionizados, e de 100% para aqueles não manipulados, consistindo no primeiro estudo a utilizar o laser no aumento da permeabilidade coriônica em peixes e abrindo um campo profícuo para a consecução de concentrações de ACP's suficientes à criopreservação.

2.7.2 Resistência ao frio

Como outrora sugerido, há dois tipos de injúrias provocadas pela redução da temperatura sobre os embriões de peixes, ambas relacionadas à fase de transição das membranas lipídicas: o dano direto, ou choque térmico, consequência do resfriamento rápido, e o indireto, que é dependente das taxas de congelamento e, geralmente, se manifesta após longo período de exposição às baixas temperaturas.

Estudos em que houve remoção do vitelo por microaspiração têm demonstrado que a redução na sensibilidade ao congelamento é possível por meio da redução do conteúdo lipídico do embrião (LIU; ZHANG; RAWSON, 2001). Considerando ainda que os danos causados pela redução da temperatura estão associados às desordens metabólicas em função da inibição dos processos enzimáticos (DINNYÉS et al., 1998), alguns experimentos, como o de Zhang et al. (2003), foram conduzidos em condições de anoxia, objetivando retardar o desenvolvimento; porém, nenhuma resistência ao congelamento foi conseguida.

As proteínas anticongelantes (AFP) foram descobertas há mais de 30 anos no sangue de peixes da Antártica, como o *Pseudopleuronectes americanus*. As AFP, juntamente com as glicoproteínas anticongelantes, são necessárias à sobrevivência em águas abaixo de 0°C por absorverem os cristais de gelo e

prevenirem o crescimento dos mesmos (MAKAREVICH et al., 2010). Uma vez que *Pseudopleuronectes americanus* expressa três categorias de AFP do tipo I no tecido sanguíneo (hepática pequena, hepática hiperativa e cutânea), Young e Fletcher (2008) pesquisaram a presença destas proteínas nos embriões. Nenhuma atividade de AFP foi detectada nos embriões logo após a fertilização, e níveis reduzidos foram detectados nos embriões dos 4 aos 11 dias seguintes. A análise de PCR (reação em cadeia da polimerase) da transcriptase reversa do RNAm revelou a expressão de sete diferentes subtipos de genes para a AFP tipo I cutânea, sem expressão das demais categorias. Três anos antes, Robles et al. (2005) vitrificaram embriões da mesma espécie e, embora tenham continuado a se desenvolver após o descongelamento, não atingiram a fase de eclosão.

O papel protetor das AFP em embriões de peixes tem sido estudado por meio de duas técnicas principais. A primeira delas, utilizada por Robles et al. (2006), consiste na microinjeção das referidas proteínas. Os autores testaram embriões em estágios de 1 célula (antes da formação do córion) e em início de desprendimento da cauda (no espaço perivitelínico e dentro saco vitelínico), utilizando AFP III combinada com metanol, DMSO e etilenoglicol, sem submissão ao frio. Verificaram que os estágios mais precoces são muito mais sensíveis, mesmo na presença das AFP. Por outro lado, independente do local de injeção, não houve redução da sobrevivência embrionária, mesmo quando da utilização dos crioprotetores. Este resultado traz novas possibilidades à vitrificação, uma vez que, dado o elevado conteúdo lipídico do saco vitelínico, pode ocorrer recristalização neste compartimento durante o descongelamento.

Embriões de *Sparus aurata* também sofreram microinjeções de AFP I, em dois estágios de desenvolvimento, 2 células e blástula, na interface blastômero-vitelo e dentro do saco vitelínico, respectivamente (ROBLES et al., 2007). O tratamento controle, bem como os embriões apenas manipulados e aqueles microinjetados foram submetidos ao resfriamento a 0°C, por 1 h e a -

10°C, por 15 minutos. Os embriões submetidos à temperatura de -10°C foram incubados previamente com solução de DMSO 3 M objetivando inibir a cristalização na solução externa. Para se estudar a distribuição da AFP I nos embriões microinjetados, os pesquisadores utilizaram um estudo com microscopia confocal. Os resultados demonstraram que a AFP I pode melhorar significativamente a resistência ao frio a 0°C, particularmente nos embriões na fase de 2 células, que atingiram quase 100% de eclodibilidade. A microscopia confocal permitiu confirmar a presença da AFP I nos sítios injetados e relacionar os resultados à sua ação de proteger as estruturas pela estabilização das membranas celulares. Como a injeção dentro do saco vitelínico ou na interface com os blastômeros aumentou significativamente a resistência ao frio, os autores recomendaram que a metodologia pudesse ser incluída nos protocolos como etapa complementar.

Diferentemente, Martínez-Páramo et al. (2009) testaram, durante a vitrificação, a técnica mais comum de utilização das AFP, que é a incorporação ao meio de incubação, não invasiva e sem microinjeção. Eles avaliaram duas proteínas anticongelantes e uma delas proporcionou a preservação da morfologia e da viabilidade embrionária, embora a vitrificação tenha provocado a morte de todos os embriões pela perda total da função celular (necrose celular) após 6 horas de cultivo. Isto pode evidenciar que o insucesso da vitrificação se deva às alterações biomoleculares que ainda não foram compreendidas.

Embora os teleósteos sejam altamente sensíveis ao frio, outros animais tão sensíveis quanto os peixes, como a *Drosophila* e os suínos, tiveram os embriões criopreservados satisfatoriamente. Uma alternativa é evitar a exposição por longos períodos às zonas térmicas críticas às quais os embriões exibem especial sensibilidade. A aplicação de taxas de congelamento extremamente rápidas utilizadas na vitrificação, como aquelas próximas a -2000°C/min, são a melhor estratégia para se reduzirem os danos celulares ao embrião (ROBLES et

al., 2008), mas o uso de AFP ou sua expressão gênica pode auxiliar no avanço das pesquisas, como já salientado.

Acredita-se que concentrações reduzidas de acetato de polivinila (PVA) são capazes de inibir a cristalização em meio a soluções contendo ACP. Esta inibição é aumentada à medida que o peso molecular do composto diminui. Sendo assim, um copolímero de PVA de peso molecular de 2 kDa, nas concentrações de 0,001%, 0,01%, 0,1% e 1%, reduziu a concentração de DMSO necessária à vitrificação em 1%, 2%, 2% e 3%, respectivamente. A redução observada foi ainda maior para o metanol (1%, 3%, 4% e 5%, respectivamente). Segundo Wowk et al. (2000), autores da pesquisa em sistemas não biológicos, polímeros de PVA são moléculas sintéticas simples, de menor custo que as AFP e, juntamente com outros agentes inibidores da cristalização, podem significar novas alternativas ao controle da formação de cristais de gelo durante a criopreservação.

2.8 Criopreservação de blastômeros, células-tronco embrionárias e células germinativas primordiais

A despeito da preservação de todo o embrião, é possível criopreservar genomas diploides de peixes utilizando-se blastômeros. A criopreservação destas células é valiosa para a conservação do patrimônio genético, em particular daquelas espécies ameaçadas. Além de favorecer a manutenção de importantes linhagens comerciais, a técnica repercute favoravelmente no campo da bioengenharia, pela criação de quimeras em que há a introdução do blastômero dentro do embrião hospedeiro ou pela produção de clones e transplante para dentro de um ovócito enucleado. O procedimento de transferência é de execução relativamente fácil e capaz de gerar progênes normais.

O primeiro estudo a relatar o uso do congelamento lento como metodologia de criopreservação de blastômeros de peixes foi o trabalho realizado por Lin, Zhang e Rawson (2009), que observaram mais de 70% de sobrevivência de blastômeros em 50% de epibolia de *Danio rerio*. Entretanto, a vitrificação tem sido a técnica mais comum em ensaios com blastômeros, células-tronco embrionárias e células primordiais de peixes.

A taxa máxima de recuperação de células germinativas primordiais (CGP) vivas em embriões vitrificados, cujo vitelo foi removido, alcançou 90%, e, cerca de 50% destas apresentaram movimentos pseudopodais (HIGAKI et al., 2010). As CGP foram, então, transplantadas para embriões em blastulação e os autores conseguiram demonstrar sua presença nas cristas genitais, caracterizando a sobrevivência de embriões capazes de se reproduzirem e gerarem progênie idêntica aos embriões vitrificados doadores das CGP. Em outras espécies, como *Oncorhynchus mykiss*, a criopreservação do blastoderma em gastrulação já é bem-sucedida (BABIÁK et al., 2008).

Ressalta-se que as taxas de sobrevivência de blastômeros criopreservados diferem entre as espécies e entre os protocolos utilizados. Strussmann et al. (1999) criopreservaram blastômeros de três espécies representativas dos ambientes marinho (*Sillago japonica*), estuarino (*Odontesthes bonariensis*) e dulcícola (*Oryzias latipes*), e obtiveram taxas de sobrevivência médias que variaram desde 19,9%, para a primeira espécie, até 67,4% para a segunda. Os autores recomendaram ainda taxas de resfriamento próximas ou inferiores a $-21,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ para uma criopreservação bem-sucedida de blastômeros de peixes. Já Kusuda et al. (2004) examinaram a pluripotência de blastômeros criopreservados de *Carassius auratus* na fase de blástula, e obtiveram 44-55% de sobrevivência após a vitrificação. Os autores verificaram ainda que os blastômeros transplantados eram histologicamente derivados dos três folhetos germinativos, o que leva a crer que os blastômeros retiveram sua

pluripotência após a criopreservação e eram capazes de se diferenciar tanto em linhagens de células somáticas quanto germinativas.

Cardona-Costa e Garcia-Ximenez (2007) vitrificaram de maneira bem-sucedida embriões de *Danio rerio* utilizando microvolumes de 0,25 µL, suficientes para conter todos os blastômeros de um embrião em blastulação (do estágio de 1000 células até o estágio de células oblongas). Neste procedimento, em que a permeabilidade das membranas aos crioprotetores é elevada, os blastômeros foram expostos aos ACP (etilenoglicol, propilenoglicol, DMSO, glicerol e metanol) pouco antes do congelamento. O metanol foi rejeitado por sua elevada concentração necessária à vitrificação (15 M). Todos os demais foram preparados individualmente em solução salina de Hank na concentração de 5 M. Após o descongelamento, taxas de sobrevivência de 82,8%, 87,7%, 93,4% e 73,9% foram obtidas com etilenoglicol, propilenoglicol, DMSO e glicerol, respectivamente, evidenciando o sucesso da técnica, e, sobretudo, da utilização do DMSO, que permitiu uma recuperação de 20% do total de blastômeros de cada embrião em blastulação. As taxas de sobrevivência de blastômeros de *Oncorhynchus keta* vitrificados por Kusuda, Teranishi e Koide (2002) foram mais modestas (59,3%), mas o destaque do trabalho, único até agora com criopreservação de blastômeros da espécie, foi o da utilização de soro fetal bovino como meio diluente dos ACP.

Em se tratando da formação de bancos de germoplasma, deve-se ponderar sobre o efeito deletério que a biotecnologia pode promover sobre a integridade do DNA. Com este objetivo, Kopeika et al. (2005) analisaram o DNA mitocondrial de blastômeros de *Danio rerio* criopreservados e observaram que o protocolo aumentou significativamente a frequência de mutações; segundo eles, mais investigações seriam necessárias para se conhecer se tais alterações interfeririam na função celular e seriam a causa de muitos embriões descongelados aparentemente viáveis não chegarem à fase de eclosão. Uma

pesquisa posterior confirmou tais efeitos em genes da família *Pax*. Lin et al. (2009) utilizaram PCR em tempo real a fim de determinar o efeito do resfriamento de embriões e da criopreservação de blastômeros de *Danio rerio* sobre a expressão dos genes *Pax2a*, *Pax2b*, *Pax5* e *Pax8*. A criopreservação afetou a expressão dos genes nos blastômeros, exceto para o gene *Pax8*.

Apesar das modificações genéticas apontadas até agora, a criopreservação de blastômeros e CGP pode representar a alternativa à criopreservação dos embriões de peixes e permitir a conservação de células geneticamente modificadas ainda não cultivadas. Já os cariótipos das células-tronco de *Labeo rohita* se mantiveram normais e as células permaneceram indiferenciáveis durante todo o congelamento (DASH et al., 2008), sugerindo uma utilidade futura do protocolo utilizado para a diferenciação *in vitro* e para a manipulação de células-tronco de peixes, servindo de modelo para a cultura destas células em espécies de mamíferos.

Routray et al. (2010) avaliaram a toxicidade de diversos ACP (etilenoglicol, propilenoglicol e glicerol) sobre as células-tronco de *Brachydanio frankei* após a vitrificação. Entre aqueles, o primeiro, na concentração de 1,8 M, propiciou 70% de viabilidade. As células viáveis mantiveram suas propriedades características em relação àquelas não submetidas a qualquer tratamento. As células-tronco provieram de blastômeros resfriados com os mesmo crioprotetores e a taxa de viabilidade média com etilenoglicol e propilenoglicol foi superior a 70%, mostrando que a criopreservação de blastômeros e células-tronco é uma realidade possível e uma alternativa viável à criopreservação de embriões.

2.9 Criopreservação de embriões de espécies reofílicas brasileiras

Assim como o *Danio rerio* é a espécie de peixe modelo para a maioria dos pesquisadores na área de reprodução de peixes de água doce fora do Brasil, em nosso país, a curimba, *Prochilodus lineatus*, vem sendo utilizada por vários pesquisadores como arquétipo por apresentar grande prolificidade, e valores econômicos e ecológicos significativos (NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006). Todavia, poucos trabalhos com criopreservação de embriões de peixes de nossas bacias são publicados, diferentemente da pesquisa com espermatozoides.

Até o momento, um artigo com *Prochilodus lineatus* e outro com pacu, *Piaractus mesopotamicus*, tiveram como objetivo estabelecer protocolos de criopreservação de embriões e ou obter informações acerca do comportamento embrionário de espécies sul-americanas submetidas a protocolos de criopreservação. A discussão mais detalhada destes artigos é necessária à divulgação mais completa possível do que é realizado para espécies cuja importância ecológica é tão premente.

Ninhaus-Silveira et al. (2009) utilizaram um protocolo adaptado de várias pesquisas com espécies europeias, na tentativa de criopreservar com sucesso os embriões de *Prochilodus lineatus*. Eles testaram inicialmente a toxicidade dos crioprotetores em embriões decorionizados de três fêmeas em dois estágios de desenvolvimento: mórula (1,5 h/28°C) e 4-6 somitos (7 h/28°C). A extração do córion foi obtida mediante tratamento com pronase e os crioprotetores testados foram etilenoglicol monometiléter e propilenoglicol monometiléter, metanol, propilenoglicol e DMSO, todos nas concentrações de 1,0 M ou 1,5 M, e acrescidos de sacarose 0,1 M. Os embriões foram submersos nas soluções vitrificantes por três períodos de exposição, 1, 5 e 15 minutos. Após a exposição, os embriões foram lavados e incubados. As larvas que

eclodiram foram fixadas e avaliadas morfológicamente. Nenhum dos embriões em mórula, independentemente do ACP utilizado, sobreviveu, enquanto aqueles entre quatro e seis somitos expostos ao DMSO apresentaram a maior taxa de sobrevivência (78,95%); a menor frequência de anormalidades (6,67%) foi obtida, entretanto, quando o propilenoglicol 1 M foi utilizado por 1 minuto.

O experimento de criopreservação foi realizado testando-se duas soluções, uma com DMSO e outra com propilenoglicol, ambas nas concentrações de 1,5 M e acrescidas de sacarose 0,1 M. Os embriões foram acondicionados em palhetas de 0,5 mL de capacidade, e dois métodos de criopreservação foram empregados: o congelamento rápido e a vitrificação. A redução rápida da temperatura no primeiro procedimento foi desempenhada pelo vapor de N_{2(l)}. Os embriões foram alocados dentro de uma caixa de poliestireno, 1 cm acima da lâmina de N_{2(l)}, o que, segundo os autores, permitiu aos embriões atingirem, dentro de 10 minutos, a temperatura de -185°C. Ding, Xiao e Li (2007) utilizaram o mesmo artefato no congelamento dos embriões de *Pagrus major*, com a diferença que os embriões foram alocados diretamente sobre uma prateleira no nível do nitrogênio. Imediatamente após, os embriões foram transferidos para um botijão e imersos no N_{2(l)}, a uma temperatura de -196°C. A vitrificação, por sua vez, envolveu a transferência direta dos embriões para o N_{2(l)}. O descongelamento foi realizado pela imersão das palhetas em água a 36°C por 10 segundos ou a 70°C por 5 segundos, e os embriões alocados diretamente nas incubadoras ou lavados previamente com solução salina ou água destilada. Nenhum dos protocolos de congelamento ou descongelamento foi eficaz em preservar a viabilidade dos embriões. As análises ultraestruturais de embriões congelados e descongelados demonstraram que as células da ectoderme, somitos, notocorda e endoderme foram totalmente preservadas, com núcleos e mitocôndrias bem conservados. Os glóbulos de vitelo foram capazes de tolerar o processo de congelamento, mas a membrana sincicial do vitelo apresentou-se

desorganizada, exibindo uma aparência elétron-densa e compactada, retículos colapsados, núcleos com cromatina modificada e rupturas na membrana plasmática na zona de contato com a endoderme. Os pesquisadores concluíram que os procedimentos de criopreservação testados foram incapazes de evitar a formação de cristais de gelo intracelulares, levando a modificações morfológicas drásticas e à consequente produção de embriões de *Piaractus lineatus* inviáveis.

O mesmo grupo de pesquisadores (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2007) objetivaram identificar e caracterizar a membrana sincicial do vitelo, tida como um dos principais obstáculos à criopreservação de embriões de peixes. As análises morfológicas, realizadas sob microscopia eletrônica de transmissão ou de varredura, caracterizaram a membrana como sendo a interface entre o vitelo e as células do embrião que, além de sustentar e individualizar o vitelo atua como uma estrutura que o torna disponível para o embrião. O mais significativo, sob o âmbito da criopreservação, é que as análises estruturais não identificaram possíveis barreiras à penetração de ACP.

Fornari et al. (2010) utilizaram 225 embriões de *Piaractus mesopotamicus* no estágio de pós-gástrula e os dividiram em quatro grupos, cujo objetivo era testar diferentes concentrações de sacarose (8,5%; 17,0%; 25,0% ou 34,0%). Todas as soluções foram adicionalmente acrescidas de 9,0% de metanol, como ACP interno. Os embriões foram envasados igualmente em palhetas de 0,5 mL e submetidos à curva de resfriamento até se estabilizarem em -7°C, valendo-se de um biocongelador programável. A diminuição gradual da temperatura foi de 0,5 °C/min. Em seguida, a temperatura foi reduzida, permanecendo em -33°C por 6 min, antes da imersão em N_{2(l)}. Os embriões foram descongelados em água a 45°C por 15 s, conforme protocolo utilizado por Streit Júnior et al. (2007). A microscopia eletrônica de varredura mostrou que houve alterações substanciais na morfologia do embrião, sobretudo para a maior concentração de sacarose.

Essas soluções não impediram a formação de cristais de gelo, que levaram a deformidades letais aos embriões. Contudo, o reduzido nível de deformidades morfológicas observado para os embriões tratados com solução de 17,0% de sacarose e 9,0% de metanol avigoram, segundo os autores, uma argumentação convincente para a realização de estudos adicionais.

Os resultados almejados para a criopreservação já foram obtidos para o resfriamento dos embriões de algumas espécies reofílicas, e, apesar do reduzido tempo de viabilidade embrionária disponível por esta metodologia, tornam-se importantes para a melhoria do manejo em estações de piscicultura. Entre as espécies migradoras, Streit Júnior et al. (2007) resfriaram por seis horas embriões de *Piaractus mesopotamicus* utilizando um protocolo que consistiu na exposição dos embriões em pós-gástrula às soluções crioprotetoras e consequente submissão a uma curva de resfriamento até alcançarem -8°C.

Entre as várias combinações entre ACP externos, como sacarose, geleia real, e os internos etilenoglicol e metanol, os autores identificaram que a combinação metanol 9% e sacarose 0,5 M possibilitou a eclosão de 69,2%, o que, provavelmente, incentivou Lopes et al. (2011) a utilizá-la no resfriamento dos embriões da mesma espécie. Contudo, estes investigaram quatro estágios de desenvolvimento (64 células, 25% de epibolia, fechamento do blastóporo e aparecimento da vesícula óptica), além de uma curva de resfriamento com mais etapas. Não houve diferença entre os estágios finais quanto à taxa de eclosão, que alcançou 55,2% para a mais tardia, e uma correlação negativa entre o diâmetro embrionário e o número total de larvas eclodidas foi verificada, evidenciando diferenças na permeabilidade das membranas à solução em função da fase de desenvolvimento.

Assim como para os embriões de *Piaractus mesopotamicus*, o metanol foi o crioprotetor intracelular que maiores porcentagens de larvas viáveis proporcionou aos embriões de *Prochilodus lineatus*, quando comparado com o

DMSO (PEREIRA, 2010). Como esperado, a taxa de viabilidade larval após a eclosão apresentou ainda regressão linear inversa em relação à concentração da solução crioprotetora utilizada. Isto pode ser inferido também aos ACP internos, como a sacarose, conforme verificado para os embriões de *Piaractus mesopotamicus* (STREIT JÚNIOR et al., 2007).

A pesquisa a respeito da toxicidade de ACP sobre embriões de espécies reofílicas comprova que a associação de diferentes soluções reduz a concentração individual de cada ACP e atenua o efeito maléfico que cada um pode exercer sobre as células embrionárias. A combinação de sacarose e 7% de etilenoglicol mostrou ser a melhor solução para a preservação do vitelo e das camadas germinativas em *Piaractus mesopotamicus*, superior até mesmo que o metanol (NEVES, 2008). O uso de glicerol e metanol isoladamente na concentração de 10%, à temperatura de 27°C, sobre os embriões de tambaqui (*Colossoma macroporum*) permitiu a eclosão de 74% e 87% das larvas, respectivamente (FORNARI et al., 2011). Entretanto, na concentração de 30%, os crioprotetores se mostraram letalmente tóxicos, impossibilitando a eclosão. Provavelmente, a associação de diferentes crioprotetores poderia permitir resultados melhores para a espécie e diminuir sua toxicidade individual.

Embora não fosse possível recuperar embriões viáveis e obter larvas a partir dos embriões congelados para nenhuma espécie autóctone de nossas bacias, os estudos já realizados marcam o início da agregação de conhecimentos a respeito de espécies nativas e migradoras. Paralelamente a outras táticas que visem evitar a extinção do patrimônio genético, a criopreservação de embriões de tais espécies pode concorrer para a preservação de blastômeros e células primordiais, o que despenderá esforços multissetoriais a fim de que possam acompanhar a evolução daquelas espécies estudadas há mais tempo em outros locais do mundo.

3 OBJETIVO E ESCOPO DA TESE

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral com este trabalho foi testar crioprotetores e protocolos de resfriamento e congelamento de embriões de dourado, piracanjuba (Artigo 1) e piapara (Artigo 2).

3.2 Objetivos específicos

Especificamente, buscou-se:

- a) avaliar a sensibilidade dos embriões ao resfriamento;
- b) analisar a toxicidade de duas soluções crioprotetoras em diferentes concentrações;
- c) analisar a eficiência dos crioprotetores e dos protocolos de resfriamento e congelamento;
- d) identificar lesões embrionárias após o congelamento e tentar identificar suas causas.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ainda não foi possível obter larvas de peixes provenientes de embriões criopreservados em qualidade ou quantidade, muito embora a morfologia tenha sido preservada e a sobrevivência embrionária prolongada.

A pesquisa de soluções crioprotetoras e de suas concentrações, assim como de taxas de descongelamento e impedimento da (re)cristalização, não devem prescindir de estudos bioquímicos apurados e criteriosos que definam o comportamento dos vários compartimentos do embrião. Possivelmente, o sucesso da vitrificação será alcançado à medida que as estabilidades gênicas e enzimáticas também o forem.

As espécies ameaçadas de extinção dependem de biotecnologias que possibilitem perpetuar seu patrimônio genético. Para tanto, são necessários investimentos econômicos e integração de pesquisadores visando reduzir a assincronia entre a destruição das espécies e o sucesso das pesquisas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, S. L.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. The effect of external medium composition on membrane water permeability of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, Woburn, v. 64, n. 7, p. 1591-1602, July 2005.
- AHAMMAD, M. M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B. B. Hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos stored at 4 and -2 degrees C in different concentrations of methanol and sucrose. **Theriogenology**, Woburn, v. 60, n. 8, p. 1409-1422, Aug. 2003.
- ANIL, S. et al. Studies on cryoprotectant toxicity to zebrafish (*Danio rerio*) ovarian tissue fragments. **Cryoletters**, Lewes, v. 32, n. 1, p. 40-50, Jan. 2011.
- ARAYA, P. R.; AGOSTINHO, A. A.; BECHARA, J. A. The influence of dam construction on a population of *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1847) (Pisces, Anostomidae) in the Yacyretá Reservoir (Argentina). **Fisheries Research**, New York, v. 74, n. 2, p. 198-209, Apr. 2005.
- BABIÁK, I. et al. Cryopreservation of rainbow trout blastoderm. **Cybium**, Paris, v. 32, n. 2, p. 139-141, Apr. 2008.
- BEIRÃO, J. et al. Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 261, n. 3, p. 897-903, June 2006.
- BILLARD, B.; ZHANG, T. **Techniques of genetic resource banking in fish**. London: Taylor and Francis Books, 2001. 46 p. (Cryobanking the Genetic Resources: Wildlife Conservation for the Future?).
- BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. **Peixes do Pantanal: manual de identificação**. Brasília: EMBRAPA, 1999. 184 p.
- BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. (Ed.). **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. 2. ed. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007. 195 p.

CABRITA, E. et al. Dimethyl sulfoxide influx in turbot embryos exposed to a vitrification protocol. **Theriogenology**, Woburn, v. 60, n. 3, p. 463-473, 2003a.

_____. Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). **Cryobiology**, San Diego, v. 47, n. 3, p. 204-213, 2003b.

_____. Effect of different treatments on the chorion permeability to DMSO of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 221, n. 1/4, p. 593-604, 2003c.

_____. Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 251, n. 2/4, p. 245-255, 2006.

CARDONA-COSTA, J.; FRANCISCO-SIMÃO, M.; GARCIA-XIMENEZ, F. Can vitrified zebrafish blastomeres be used to obtain germ-line chimaeras? **Cryoletters**, v. 30, n. 6, p. 422-428, June 2009.

CARDONA-COSTA, J.; GARCIA-XIMENEZ, F. Vitrification of zebrafish embryo blastomeres in microvolumes. **Cryoletters**, Lewes, v. 28, n. 4, p. 303-308, 2007.

CARVALHO, S. **Avaliação da qualidade de *Leporinus obtusidens* (piava) comercializada no mercado público de Porto Alegre através de metais-traço advindas do lago Guaíba, RS**. 2004. 55 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

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

CHAO, N. H.; LIAO, I. C. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, n. 1/4, p. 161-189, 2001.

CHEN, S. L.; TIAN, Y. S. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. **Theriogenology**, Woburn, v. 63, n. 1, p. 1207-1219, May 2005.

CRESCÊNCIO, R. Ictiofauna brasileira e seu potencial para criação. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005. p. 23-33.

DASH, S. N. et al. Use of the non-toxic cryoprotectant trehalose enhances recovery and function of fish embryonic stem cells following cryogenic storage. **Current Stem Cell Research & Therapy**, Sharjah, v. 3, n. 4, p. 277-287, Apr. 2008.

DELLA FLORA, M. A. et al. Biologia e cultivo do dourado (*Salminus brasiliensis*). **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 4, n. 1, p. 7-14, 2010.

DIAS JÚNIOR, W.; MOURGUÉS-SHURTER, L. R. Comportamento alimentar, determinação do horário de fornecimento e do tempo de disponibilidade da ração para *Leporinus obtusidens* Valenciennes, 1847 (Osteichtshyes, Characiformes, Anostomidae) (Piau). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 5, p. 1043-1050, set./out. 2001.

DING, F. H.; XIAO, Z. Z.; LI, J. Preliminary studies on the vitrification of red sea bream (*Pagrus major*) embryos. **Theriogenology**, Woburn, v. 68, n. 5, p. 702-708, 2007.

DINNYÉS, A. et al. Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants: work in progress. **Theriogenology**, Woburn, v. 50, n. 1, p. 1-13, Mar. 1998.

DIWAN, A. D. et al. Cryopreservation of fish gametes and embryos. **Indian Journal of Animal Sciences**, New Delhi, v. 80, n. 4, p. 109-124, Apr. 2010.

DOBRINSKY, J. R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. **Theriogenology**, Woburn, v. 57, n. 1, p. 285-302, Jan. 2002.

EDASHIGE, K. et al. Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos are difficult to cryopreserve by vitrification. **Cryobiology**, San Diego, v. 53, n. 1, p. 96-106, Jan. 2006.

EL-BATTAWY, K. A.; LINHART, O. Preliminary studies on cryopreservation of common tench (*Tinca tinca*) embryos: work in progress. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 44, n. 4, p. 718-723, Apr. 2009.

ESTEVEZ, K. E.; PINTO-LOBO, A. V. Feeding pattern of *Salminus maxillosus* (Pisces Characidae) at Cachoeira das Emas, Mogi-Guaçu River, São Paulo State, Southeast Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 61, n. 2, p. 267-276, Apr. 2001.

FORNARI, D. C. et al. Freezing injuries in the embryos of *Piaractus mesopotamicus*. **Zygote**, Cambridge, v. 19, n. 4, p. 1-6, Nov. 2010.

_____. Toxidez dos crioprotetores utilizados na vitrificação de embriões de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). In: CONFERÊNCIA LATINOAMERICANA SOBRE CULTIVO DE PEIXES NATIVOS, 3.; CONGRESSO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS, 3., 2011, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2011. 1 CD-ROM.

FROESE, R.; PAULY, D. (Ed.). **FishBase**. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>>. Acesso em: 18 jul. 2012.

GALO, J. M. et al. Spermatic abnormalities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) after cryopreservation. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 71, n. 3, p. 693-699, June 2011.

GODINHO, H. P. Criopreservação de sêmen de peixes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 203, p. 16-20, mar./abr. 2000.

_____. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aqüicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 351-360, jul./set. 2007.

GODOY, M. P. de. **Peixes do Brasil**: subordem characoidei. Piracicaba: Franciscana, 1975. v. 3, 229 p.

GUAN, M.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes by vitrification. **Cryoletters**, Lewes, v. 31, n. 3, p. 230-238, Mar. 2010.

HAGEDORN, M. et al. Altering fish embryos with aquaporin-3: an essential step toward successful cryopreservation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 67, n. 3, p. 961-966, June 2002.

_____. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option. **Cryobiology**, San Diego, v. 49, n. 2, p. 181-189, Apr. 2004.

HARTZ, S. M. et al. Alimentação da Piava (*Leporinus obtusidens*) no Lago Guaíba, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 6, n. 1, p. 145-150, 2000.

HIGAKI, S. et al. Feasibility of cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by whole embryo freezing. **Japanese Journal of Veterinary Research**, Sapporo, v. 57, n. 2, p. 119-128, Feb. 2009.

_____. Production of fertile zebrafish (*Danio rerio*) possessing germ cells (gametes) originated from primordial germ cells recovered from vitrified embryos. **Reproduction**, Cambridge, v. 139, n. 4, p. 733-740, Aug. 2010.

JANIK, M.; KLEINHANS, F. W.; HAGEDORN, M. Overcoming a permeability barrier by microinjecting cryoprotectants into zebrafish embryos (*Brachydanio rerio*). **Cryobiology**, San Diego, v. 41, n. 1, p. 25-34, Jan. 2000.

KOHLI, V. et al. An alternative method for delivering exogenous material into developing zebrafish embryos. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 98, n. 6, p. 1230-1241, Dec. 2007.

KOPEIKA, J. et al. Effect of cryopreservation on mitochondrial DNA of zebrafish (*Danio rerio*) blastomere cells. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 570, n. 1, p. 49-61, 2005.

KUSUDA, S. et al. Pluripotency of cryopreserved blastomeres of the goldfish. **Journal of Experimental Zoology Part A-Ecological Genetics and Physiology**, Hoboken, v. 301A, n. 2, p. 131-138, 2004.

KUSUDA, S.; TERANISHI, T.; KOIDE, N. Cryopreservation of chum salmon blastomeres by the straw method. **Cryobiology**, San Diego, v. 45, n. 1, p. 60-67, Jan. 2002.

LAHNSTEINER, F. The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, Woburn, v. 69, n. 3, p. 384-396, Mar. 2008.

LANCE, S. L.; PETERSON, A. S.; HAGEDORN, M. Developmental expression of aquaporin-3 in zebrafish embryos (*Danio rerio*). **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, Oxford, v. 138, n. 3, p. 251-258, 2004.

LI, J. et al. Extra-and intra-cellular ice formation of red seabream (*Pagrus major*) embryos at different cooling rates. **Cryobiology**, San Diego, v. 59, n. 1, p. 48-53, Jan. 2009.

LIMA, F. C. T.; BRITSKI, H. A. *Salminus franciscanus*, a new species from the rio São Francisco basin, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 5, n. 3, p. 237-244, June 2007.

LIN, C. et al. Effect of chilling and cryopreservation on expression of Pax genes in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and blastomeres. **Cryobiology**, San Diego, v. 59, n. 1, p. 42-47, Jan. 2009.

LIN, C.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) blastomeres by controlled slow cooling. **Cryoletters**, Lewes, v. 30, n. 2, p. 132-141, Feb. 2009.

LIU, X. H.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Effect of cooling rate and partial removal of yolk on the chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, Woburn, v. 55, n. 8, p. 1719-1731, Aug. 2001.

_____. Feasibility of vitrification of zebrafish (*Danio rerio*) embryos using methanol. **Cryoletters**, Lewes, v. 19, n. 5, p. 309-318, Sept. 1998.

LOPES, T. S. et al. Cooling of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos at various stages of development for 6 or 10 hours. **Theriogenology**, Woburn, v. 75, n. 3, p. 570-76, Feb. 2011.

MACHADO, A. B. M. **Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção:** incluindo as espécies quase ameaçadas e deficientes em dados. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2005. 160 p.

MAKAREVICH, A. V. et al. Several aspects of animal embryo cryopreservation: anti-freeze protein (AFP) as a potential cryoprotectant. **Zygote**, Cambridge, v. 18, n. 2, p. 145-153, Apr. 2010.

MARIA, A. N. et al. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 260, n. 1/4, p. 298-306, 2006.

MARQUES, A. A. B. **Lista de referência da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul:** decreto nº 41.672, de 10 de Junho de 2002. Porto Alegre: FZB/MCT-PUCRS/PANGAEA, 2002. 52 p.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S. et al. Advances on fish embryo cryopreservation using antifreeze proteins. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY-FOR-

THE-STUDY-OF-REPRODUCTION LOCATION, 41., 2008, Kona.
Abstracts... Champaign: Society of Study Reproduction, 2008a. p. 152.

_____. Cryoprotective effects of antifreeze proteins delivered into zebrafish embryos. **Cryobiology**, San Diego, v. 58, n. 2, p. 128-133, Apr. 2009.

_____. Incorporation of antifreeze proteins into zebrafish embryos by a non-invasive method. **Cryobiology**, San Diego, v. 56, n. 3, p. 216-222, Mar. 2008b.

MILIORINI, A. B. et al. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 177-187, Feb. 2011.

_____. Resfriamento do sêmen de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) a 4°C, utilizando diferentes concentrações de dimetilsulfóxido. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 209-211, 2002.

MORAIS FILHO, M. B.; SCHUBART, O. **Contribuição ao estudo do dourado (*Salminus maxillosus*) do rio Mogi Guaçu**. São Paulo: Ministério da Agricultura, 1955. 131 p.

MURGAS, L. D. S. et al. Viabilidade seminal de Piapara (*Leporinus obtusidens*), empregando-se diferentes diluentes, no resfriamento do sêmen à 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 211-213, 2002.

MURGAS, L. D. S.; FRANCISCATTO, R. T.; SANTOS, A. G. O. Avaliação espermática pós-congelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, n. 6, p. 1810-1814, nov./dez. 2003a.

_____. Sperm evaluation of Piracanjuba fish (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849), after thawing. **Brazilian Journal of Animal Science**, Viçosa, MG, v. 32, n. 6, p. 1810-1814, Dec. 2003b.

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: EDUEM, 2001. 378 p.

NEVES, P. R. **Utilização de crioprotetores intra e extracelulares em embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2008. 71 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.

NINHAUS-SILVEIRA, A. et al. Cryogenic preservation of embryos of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote**, Cambridge, v. 17, n. 1, p. 45-55, Feb. 2009.

_____. Structural and ultrastructural characteristics of the yolk syncytial layer in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Teleostei; Prochilodontidae). **Zygote**, Cambridge, v. 15, n. 3, p. 267-271, June 2007.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A. de. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote**, Cambridge, v. 14, n. 3, p. 217-229, June 2006.

ÓRFAO, L. H. et al. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). **Aquaculture**, Amsteden, v. 311, n. 1/4, p. 241-247, 2011.

PEREIRA, G. J. M. **Desempenho reprodutivo e resfriamento de embriões de peixes nativas mantidas em cativeiro**. 2010. 147 f. (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

RAHMAN, S. M. et al. Suitability of cryoprotectants and impregnation protocols for embryos of Japanese whiting *Sillago japonica*. **Cryobiology**, San Diego, v. 57, n. 2, p. 170-174, Feb. 2008.

RAWSON, D. M. et al. Field emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy studies of the chorion, plasma membrane and syncytial layers of the gastrula-stage embryo of the zebrafish *Brachydanio rerio*: a consideration of the structural and functional relationships with respect to cryoprotectant penetration. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 325-336, Mar. 2000.

REYNALTE-TATAJE, D. R.; ZANIBONI FILHO, E. Cultivo do gênero *Leporinus*. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005. p. 81-104.

RIBEIRO, D. F. O.; NUÑER, A. P. O. Feed preferences of *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae) larvae in fish ponds. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 274, n. 1, p. 65-71, 2008.

ROBLES, V.; CABRITA, E.; HERRAEZ, M. P. Germplasm cryobanking in zebrafish and other aquarium model species. **Zebrafish**, New Rochelle, v. 6, n. 3, p. 281-293, 2009.

ROBLES, V. et al. Antifreeze protein type I (AFP I) increases seabream (*Sparus aurata*) embryos tolerance to low temperatures. **Theriogenology**, Woburn, v. 68, n. 2, p. 284-289, Feb. 2007.

_____. 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**, Woburn, v. 61, n. 7/8, p. 1367-1379, 2004.

_____. Embryo cryopreservation: what we know until now? In: _____. **Reproductive aquaculture: marine and freshwater species**. Boca Raton: CRC, 2008. p. 265-294.

_____. Microinjection of the antifreeze protein type III (AFPIII) in turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos: Toxicity and protein distribution. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 261, n. 4, p. 1299-1306, 2006.

_____. Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species. **Theriogenology**, Woburn, v. 64, n. 7, p. 1633-1646, July 2005.

_____. Vitrification of turbot embryos: preliminary assays. **Cryobiology**, San Diego, v. 47, n. 1, p. 30-39, Jan. 2003.

RODRIGUEZ-OLARTE, D.; TAPHORN, D. C. Abundance, feeding and reproduction of *Salminus* sp. (Pisces: Characidae) from mountains streams of the Andean piedmont in Venezuela. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 4, n. 1, p. 73-79, 2006.

ROSA, R. S.; LIMA, F. C. Os peixes ameaçados de extinção. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (Ed.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília: Fundação Biodiversitas, 2008. v. 2, p. 9-285.

ROUTRAY, P. et al. Cryopreservation of isolated blastomeres and embryonic stem-like cells of Leopard danio, *Brachydanio frankei*. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 41, n. 4, p. 579-589, Apr. 2010.

_____. Factors affecting the uptake of DMSO by the eggs and embryos of medaka, *Oryzias latipes*. **Theriogenology**, Woburn, v. 58, n. 8, p. 1483-1496, Aug. 2002.

SANTOS, E. **Peixes de água doce**. Belo Horizonte: Itatiaia, 1981. v. 2, 60 p.
SCHUTZ, J. H.; NUÑER, A. P. O. Growth and survival of dorado *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae) post-larvae cultivated with different types of food and photoperiods. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 3, p. 435-444, 2007.

SILAKES, S.; BART, A. N. Ultrasound enhanced permeation of methanol into zebrafish, *Danio rerio*, embryos. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 303, n. 1/4, p. 71-76, 2010.

STREIT JÚNIOR, D. P. et al. Motility, vigor and pathologies in fresh and cryopreserved semen of *Piaractus mesopotamicus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 159-167, 2009.

_____. Pacu embryos submitted to different cooling protocols. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 8, p. 1199-1202, ago. 2007.

STRUSSMANN, C. A. et al. Cryopreservation of isolated fish blastomeres: effects of cell stage, cryoprotectant concentration, and cooling rate on postthawing survival. **Cryobiology**, San Diego, v. 39, n. 3, p. 252-261, June 1999.

TAITSON, P. F.; CHAMI, E.; GODINHO, H. P. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): a protocol to freeze its sperm in the field. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 105, n. 3/4, p. 283-291, 2008.

TENA-SEMPERE, M. Comparative insights of the kisspeptin/kisspeptin receptor system: lessons from non-mammalian vertebrates. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 175, n. 2, p. 234-243, Jan. 2012.

TOMIITA, F. I.; GONÇALVES, L. U.; VIEGAS, E. M. M. **Desenvolvimento embrionário do pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. Maringá: Aquaciência, 2008. 1 CD-ROM.

TSAI, S.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Development of cryopreservation protocols for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles using controlled slow cooling. **Theriogenology**, Woburn, v. 71, n. 8, p. 1266-1233, Aug. 2009.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, Woburn, v. 65, n. 1, p. 236-244, Jan. 2006.

VALDEZ, D. M. et al. Sensitivity to chilling of medaka (*Oryzias latipes*) embryos at various developmental stages. **Theriogenology**, Woburn, v. 64, n. 1, p. 112-122, Jan. 2005.

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

VAZZOLLER, A. E. A. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: Universidade de Maringá, 1996. 169 p.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Sensitivity of dourado (*Salminus brasiliensis*) spermatozoa to different cryoprotectant solutions. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 4, p. 883-889, 2009.

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 137-150, Jan. 2009.

WANG, R. Y. et al. Ultrasound enhanced methanol penetration of zebrafish (*Danio rerio*) embryos measured by permittivity changes using impedance spectroscopy. **European Biophysics Journal**, London, v. 37, n. 6, p. 1039-1044, June 2008.

WEINGARTNER, M.; ZANIBONI-FILHO, E. Dourado. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005. p. 257-286.

WOWK, B. et al. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. **Cryobiology**, San Diego, v. 40, n. 3, p. 228-236, June 2000.

YOUNG, H. M.; FLETCHER, G. L. Antifreeze protein gene expression in winter flounder pre-hatch embryos: implications for cryopreservation. **Cryobiology**, San Diego, v. 57, n. 2, p. 84-90, Apr. 2008.

ZANIBONI FILHO, E. Larvicultura de peixes de água doce. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 203, p. 69-77, mar./abr. 2000.

ZHANG, T. et al. Development of a new rapid measurement technique for fish embryo membrane permeability studies using impedance spectroscopy. **Theriogenology**, Woburn, v. 66, n. 4, p. 982-988, Apr. 2006.

ZHANG, T. T.; LIU, X. H.; RAWSON, D. M. Effects of methanol and developmental arrest on chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, Woburn, v. 59, n. 7, p. 1545-1556, July 2003.

ZHANG, Y. Z. et al. Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. **Theriogenology**, Woburn, v. 63, n. 3, p. 763-773, Mar. 2005.

ZHANG, X. S. et al. A study on the cryopreservation of common carp *Cyprinus carpio* embryos. **Cryoletters**, Lewes, v. 10, n. 5, p. 271-278, Nov. 1989.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**ARTIGO 1 Cooling and freezing of Dourado (*Salminus brasiliensis*) and Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) embryos, two endangered brazilian teleost fishes**

Aléssio B. Miliorini¹, Michelle S. Paulino, Júlio S. de S. B. Filho, Luis D. S. Murgas, Priscila V. e Rosa

Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brasil

¹ Corresponding author. Tel.: 55 (35) 3829-1122; fax: 55 (35) 3829-1122.
E-mail address: amiliorini@dmv.ufla.br (Aléssio Batista Miliorini).

ABSTRACT

Cryopreservation of fish embryos is still far from being achieved with the expected reproducibility. Thus, we studied the effects of cooling and freezing on embryos of Dourado, *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816), and Piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849), two migratory South American fish species threatened with extinction. A group of embryos from four couple of each species were immersed in solutions containing 5%, 8% and 11% of methanol or DMSO and cooled (-2°C) or not. Other two groups were incubated without cryoprotectants at 27°C (Control 1 - C1) or cooled (Control 2 - C2). Other embryos were frozen in N_{2(l)} after bathing in the same cooling solutions. Embryos of *S. brasiliensis* were less cold-sensitive. DMSO was less toxic to the embryos from both species but less effective to protect them during cooling, mainly at high levels. Lesions observed during cooling were restricted to irregularities between blastomeres and in the yolk syncytial layer, as well as yolk globules dispersed throughout the periphery of the yolk sac. The chorionic membrane was permeable to cryoprotectants, although resulting faster osmotic balance for methanol, especially in *B. orbignyanus*. Three embryos from this species treated with 8% methanol and four with 11% methanol were recovered. Two of which (11% methanol) developed up to the formation of neural plate, demonstrating that is promising to preserve *B. orbignyanus* embryos using a rapid-freezing procedure.

Keywords: Cool storage. Cryopreservation. Cryoprotectants. Dimethyl sulfoxide. Eggs. Methanol.

RESUMO

A criopreservação de embriões de peixes está longe de ser atingida com a reprodutibilidade esperada. Assim, foram estudados os efeitos do resfriamento e do congelamento sobre os embriões de Dourado, *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816), e de Piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849), duas espécies de peixes migratórias sul-americanas ameaçadas de extinção. Um grupo de embriões provenientes de quatro casais de cada espécie foi imerso em soluções contendo 5%, 8% e 11% de metanol ou DMSO e resfriados (-2° C) ou não. Outros dois grupos foram incubados sem crioprotetores à temperatura ambiente (Controle 1 - C1) ou resfriados (Controle 2 - C2). Outros embriões foram congelados em N_{2(l)} após o banho nas mesmas soluções utilizadas no resfriamento. Os embriões de *S. brasiliensis* foram menos sensíveis ao frio. O DMSO foi menos tóxico para os embriões de ambas as espécies, mas menos efetivo na sua proteção durante o resfriamento, principalmente nas concentrações mais elevadas. As lesões observadas durante o resfriamento se restringiram a irregularidades entre os blastômeros e na membrana sincicial vitelínica, bem como glóbulos de vitelo dispersos pela periferia do saco vitelínico. A membrana coriônica de ambas as espécies foi permeável aos crioprotetores, embora um equilíbrio osmótico mais rápido tenha sido verificado para o metanol, especialmente em *B. orbignyanus*. Três embriões desta espécie tratados com metanol a 8% e quatro com metanol 11% foram recuperados. Dois dos quais (11% de metanol) desenvolveram-se até a formação da placa neural, demonstrando que pode ser promissora a preservação dos embriões de *B. orbignyanus* por meio do congelamento rápido.

Palavras-chave: Preservação pelo frio. Criopreservação. Crioprotetores. Dimetilsulfóxido. Ovos. Metanol.

1 INTRODUCTION

In the field of animal breeding, cryopreservation represents a tool for preserving both paternal and maternal germplasm, facilitating genetic material transport, and preserving endangered breeds [1].

Embryonic cryopreservation is harder for aquatic species, especially fish, than for mammal. Fish embryos are more sensitive to cooling, as they have exceedingly complex structure with different compartments and membranes and are much larger than mammals.

According to Wang et al. [2], the main obstacles to cryopreservation of fish embryos are: (a) low surface/volume ratio, which hinders flow of water and cryoprotectants during freeze-thaw processes, (b) large, nutrient-rich yolk sac in particular osmotic environment, (c) increased cold-sensitivity, and (d) susceptibility to intracellular crystallization that leads to disruption of cell membranes. However, only a few studies have dealt with successful embryo preservation [3,4], and no reproducibility has been achieved since then [5].

As many Brazilian fish species, Dourado (*Salminus brasiliensis*) and Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) have great economic importance and aquaculture potential, not yet explored, in Brazil [6]. Both migrates up-stream to spawn, but their reproductive cycle has been disrupted due to overfishing and the environmental changes as pollution and the construction of hydroelectric dams. In consequence, has been a significant reduction of their populations in many South American watersheds, leading the Brazilian government to deem *B. orbignyanus* endangered already few years ago [7].

Several studies have been developed aiming at sperm preservation of neotropical fish species, including the species mentioned above [8-14]. But, embryo cryopreservation is to be yet succeeded or even studied in most of them.

An alternative for embryo cryopreservation may be freezing of oocytes [15] and ovarian follicles [16,17] because they are smaller and have more permeable and less complex membranes. However, as for sperm cells, preservation of gametes of *S. brasiliensis* and *B. orbignyana* has not been achieved or studied in the case of oocytes.

Many cryoprotectants have been utilized in embryos cryopreservation. Among them are dimethyl sulfoxide, methanol, glycerol, propylene glycol, ethylene glycol and propanediol in concentrations ranging between 1 M and 2 M for cold-water fish [18]. Nevertheless, both the type and concentration of cryoprotectant are species-specific. In previous studies, the first two have appeared to be more appropriate for embryos of those species.

Thus, the objectives of this research were to test embryos sensibility to cold, the cryoprotectant toxicity and its efficiency to protect *S. brasiliensis* and *B. orbignyana* embryos from injuries during cooling and freezing.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Embryos

The study was carried out on the Environmental Unit of Energy Company of Minas Gerais (CEMIG) in Itutinga, (21°17'53"S; 44°39'28"W), Minas Gerais, Brazil, during the spawning season (January and February, 2011).

Embryos were from two-year-old fish kept in earth tanks at 0.3 kg/m² density. Only breeders that released gametes under pressure of the coelomic cavity wall were selected. Thus, four couples from both species were selected and transferred to aquariums (males and females segregated). In *B. orbignyanus* their weights were 810 ± 15 g for males and 924 ± 22 g for females. *S. brasiliensis* males weighed 975 ± 20 g and females weighed 1118 ± 41 g.

Females underwent hormonal induction with carp pituitary extract (CPE) in two intramuscular applications of 0.5 and 5.0 mg CPE per kg of fish in a twelve-hour interval. Males underwent only second dose. *B. orbignyanus* and *S. brasiliensis* breeders released gametes after 411 and 132 hours-degree respectively. Immediately after fertilization, the eggs were transferred to funnel type incubation units (1 progeny = 1 incubation unit) and incubated in a flow-through system at 27 ± 1.1°C. All fish were handled in compliance with published guidelines for animal experimentation [19].

The embryonic development was monitored in a stereomicroscope every 30 min by evaluating a sample of 100 embryos at a time. After blastopore closure (90% epiboly) of at least 80% of embryos per sample, four experiments were conducted (Table 1).

Table 1 Summary of experimental design for cooling and freezing of *Salminus brasiliensis* and *Brycon orbignyanus* embryos.

Experiment	Treatment	PBS (%)	Methanol (%)	DMSO (%)	Sucrose (M)	Steps
1. Cold sensibility	Control 1	89.1	-	-	0.5	1. Bath 1 (25°C/10 min) 2. Bath 2 (4°C/5 min) 3. Acclimation 4. Hatching
	Control 2	89.1	-	-	0.5	1. Bath 1 (25°C/10 min) 2. Bath 2 (4°C/5 min) 3. Cooling (-2°C/6 h) 4. Acclimation 5. Hatching
2. Toxicity of Cryoprotectants	1	84.1	5 (0,12M)	-	0.5	
	2	81.1	8 (0,20M)	-	0.5	
	3	78.1	11 (0,27M)	-	0.5	
	4	84.1	-	5 (0,07M)	0.5	1. Bath 1 (25°C/10 min) 2. Bath 2 (4°C/5 min) 3. Acclimation 4. Hatching
	5	81.1	-	8 (0,11M)	0.5	
	6	78.1	-	11 (0,16M)	0.5	
3. Efficiency of cryoprotectants and protocol resistance	1	84.1	5	-	0.5	
	2	81.1	8	-	0.5	
	3	78.1	11	-	0.5	1. Bath 1 (25°C/10 min) 2. Bath 2 (4°C/5 min) 3. Cooling (-2°C/6 h) 4. Acclimation
	4	84.1	-	5	0.5	5. Hatching
	5	81.1	-	8	0.5	
	6	78.1	-	11	0.5	

“Table 1, conclusion”

Experiment	Treatment	PBS (%)	Methanol (%)	DMSO (%)	Sucrose (M)	Steps
4. Freezing	1	84.1	5	-	0.5	1. Bath 1 (4°C/10 min) 2. Bath 2 (2°C/5 min) 3. Setting in cryotubes 4. Pre-freezing at -170°C (-35.6°C/min) in N ₂ vapor 5. Rapid-freezing at -196°C/7 d 6. Thawing (60°C/8 s)
	2	81.1	8	-	0.5	
	3	78.1	11	-	0.5	
	4	84.1	-	5	0.5	
	5	81.1	-	8	0.5	
	6	78.1	-	11	0.5	
	Control	89.1	-	-	0.5	

2.2 Experiment 1: Cold sensibility

Around 2800 embryos from each species were taken from funnel type incubators using a plastic sieve. After water was drained, half (Control 1 - C1) was immersed in glass beakers at room temperature (27°C) for 10 min in a medium containing phosphate buffered saline (PBS - NaCl 8.0 g/L, KCl 0.2 g/L, Na₂HPO₄ 1.44 g/L, K₂HPO₄ 0.24 g/L), pH 7.41, and sucrose 0.5 M. Afterwards, the embryos were transferred to beakers with the same solution at 4°C for 5 min. The embryos were then acclimated in incubation water for 3 min. They were distributed among five experimental incubators 700 mL capacity. Experimental incubation process is going to be explained in section 2.5.

The other half (Control 2 - C2) was submitted at the same bath scheme of C1. However, at the end of the last bath, embryos were cooled as described in section 2.5. Finally, the embryos were drained again and distributed among five incubators after acclimation.

2.3 Experiment 2: Toxicity of cryoprotectants

For cryoprotectants toxicity experiment, approximately 8400 embryos from each species were utilized. They were immersed in glass beakers containing one of the following treatments (1400 embryos per treatment) at room temperature (27°C) for 10 min (PBS was used as base for all solutions):

- 5% Methanol plus 0.5 M sucrose;
- 8% Methanol plus 0.5 M sucrose;
- 11% Methanol plus 0.5 M sucrose;
- 5% Dimethyl sulfoxide (DMSO) plus 0.5 M sucrose;
- 8% DMSO plus 0.5 M sucrose or;

- 11% DMSO plus 0.5 M sucrose.

Afterwards, the embryos were transferred to beakers with the same solutions at 4°C for 5 min. As a last step, the embryos were drained and taken acclimated to the incubator units (also five per treatment).

2.4 Experiment 3: Efficiency of cryoprotectants during cooling

The same number of embryos and bath scheme described for experiment 2 were used. The difference is that after the last immersion, the embryos were taken to refrigerator and immersed in the treatment mediums. Their temperature was monitored and the cooling rate was $-0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. They were kept there for six hours from the time when the medium temperature reached -2°C . Then, the embryos were drained again and distributed among five incubators after acclimation.

2.5 Incubation and hatching

Incubation was performed in a flow-through system at $27 \pm 1.3^{\circ}\text{C}$. Each experimental incubator was a replicate. The embryos from experiments 1 and 2 remained there until hatching. In turn, the embryos from experiment 3 were incubated by the time that C2 embryos spent to hatch.

2.6 Evaluation of hatching rate and larval viability

After completion of embryos development (it took *S. brasiliensis* 21 h and *B. orbignyana* 16 h after fertilization for C1), the total number of larvae

(TL) was determined from each incubator. The hatching rate (HR) of an incubation unit was calculated by dividing TL by 280 and multiplying by 100.

In addition, around 100 larvae from a pool of all incubators per treatment were fixed in buffered formaldehyde [20] and morphologically analyzed taking into account dimensions and external characteristics. They were compared to the non-cooled control group. For both, a light microscope phase contrast with a 20X objective was used. It was equipped with digital camera in order to capture images, which were analyzed with the software Motic Images Plus 2.0[®].

2.7 Experiment 4: Freezing

Three hundred embryos from each species were submitted to the same treatments of experiments 2 and 3; however, temperatures of first and second baths were respectively 4°C and 2°C. Another group (control) of 300 embryos was immersed in PBS and sucrose 0,5 M following the same steps of the treated ones.

At the end of the last bath, the embryos of both groups were placed into 2.0 mL cryotubes (8 at 10 embryos per tube) and taken to a vapor cylinder *dry-shipper*. Freezing rate was approximately -35.6°C/min and vessel temperature was stabilized at about -170°C after 330 sec. After this period of time, the embryos were submerged in liquid nitrogen (-196°C) in another cylinder and stored for seven days before thawing.

Rapid thawing was proceeded by immersion of the cryotubes in water at 60°C for 8 sec. Then, the embryos were evaluated for their opacity and only translucent ones (indicating no crystal ice formation) were taken to experimental incubators and monitored until hatching or death.

2.8 Morphometric and morphological analysis of embryos

A pool of embryos from each treatment ($n = 100$) was immediately fixed in buffered formaldehyde before incubation (experiments 1-3), or after thawing (experiment 4). The fixed embryos were analyzed by light microscope phase contrast using a 20X objective and the images were captured with the same software used in the analysis of larvae.

Total embryo diameter (ED), blastoderm (BI) and yolk integrity (YI) were evaluated. Depending upon the changes to be found at the embryos, BI and YI were estimated in accordance to a subjective score scale that was suggested as follows: 5 = no morphological changes; 4 = softly altered; 3 = moderately altered; 2 = severely altered and; 1 = unviable. This classification was designed in order to eliminate the subjective nature of assessment and to promote the implementation of statistical analysis on it.

The variables from C1 and C2 were used for comparison with those of experiment 2 and the others in each cooling treatment, as well as their morphological features.

2.9 Statistical analysis

2.9.1 Bayesian hierarchical models

For the HR a generalized linear mixed model was fitted based on a logistic link on the linear predictor using “glmer()” library from R [21]. This was used as a proxy of a Bayesian analysis using non-informative priors to treatment means. For the remaining variables (ordinal categorical responses) a generalized linear mixed model was fitted based on partial probits on the linear

predictor using Markov Chain Monte Carlo samples in a fully Bayesian custom program built on R [22].

2.9.2 Preliminary analysis

A preliminary analysis was carried out to infer treatment means representing all combinations of factor levels (fixed effects). The full sib family represented in each sample was taken as a random effect (with standard normal distribution).

2.9.3 Regression analysis

A regression model with a common intercept and up to the quadratic term on concentration was fitted to the factorial structure of the 14 treatments (temperature x cryoprotectant x concentration + C1 and C2). The simplest models which deviation of regression lines are not relevant were chosen. Only best models are presented.

2.9.4 Specific models linking linear predictors and actual responses

In all cases liability was assumed to be normally distributed. For the HR a binomial model with logistic link was used. For BI and YI, cumulative normal link functions were used (corresponding to partial probit links). For inference on treatment differences at different concentrations, 95% credibility intervals were worked out for the regression lines. Limits on those intervals were used for informal hypothesis testing and to depict letters following estimates of treatment means.

3 RESULTS

3.1 *Salminus brasiliensis*

3.1.1 Experiment 1: Cold sensibility

The species was not cold sensitive because C1 hatching rate was similar to C2 (Table 2). Cooled embryos had higher ED than non-cooled. In contrast, C2 had lower BI and YI than in C1.

Table 2 Hatching rates (HR), embryo diameters (ED) and integrity of blastoderm (BI) and yolk (YI) of *Salminus brasiliensis* embryos used as controls*.

Controls	HR (%)	ED (μm)	BI (1-5)	YI (1-5)
Control 1	95.1 \pm 1.9 ^a	1524.3 \pm 7.9 ^b	3.5 \pm 0.4 ^a	4.4 \pm 0.7 ^a
Control 2	92.7 \pm 2.6 ^a	1841.3 \pm 7.9 ^a	2.9 \pm 0.1 ^b	2.6 \pm 0.4 ^b

* Means \pm SD originate from five replicates with 280 embryos each.

^{a,b} Within a column, means with a common superscript belong to overlapping Bayesian credibility intervals 95%.

3.1.2 Experiment 2: Toxicity of cryoprotectants

Except for 11%, both cryoprotectants were similar HR (Fig. 1A) and BI (Fig. 1C). Methanol provided the highest ED except for 8% (Fig. 1B), but the embryos treated with DMSO had higher YI than those treated with methanol (Fig. 1D).

3.1.3 Experiment 3: Efficiency of cryoprotectants during cooling

HR was higher when embryos were treated with methanol, being equivalent to the controls. In turn, temperature reduction combined with increase in concentration was harmful to DMSO-treated embryos (Fig. 1A). The highest ED was found in cooled embryos treated with DMSO and 5% methanol, which were even higher than in C2 (Fig. 1B). In the analysis of BI and YI, there was no difference between cryoprotectants and between these and C1 (Fig. 1C-D).

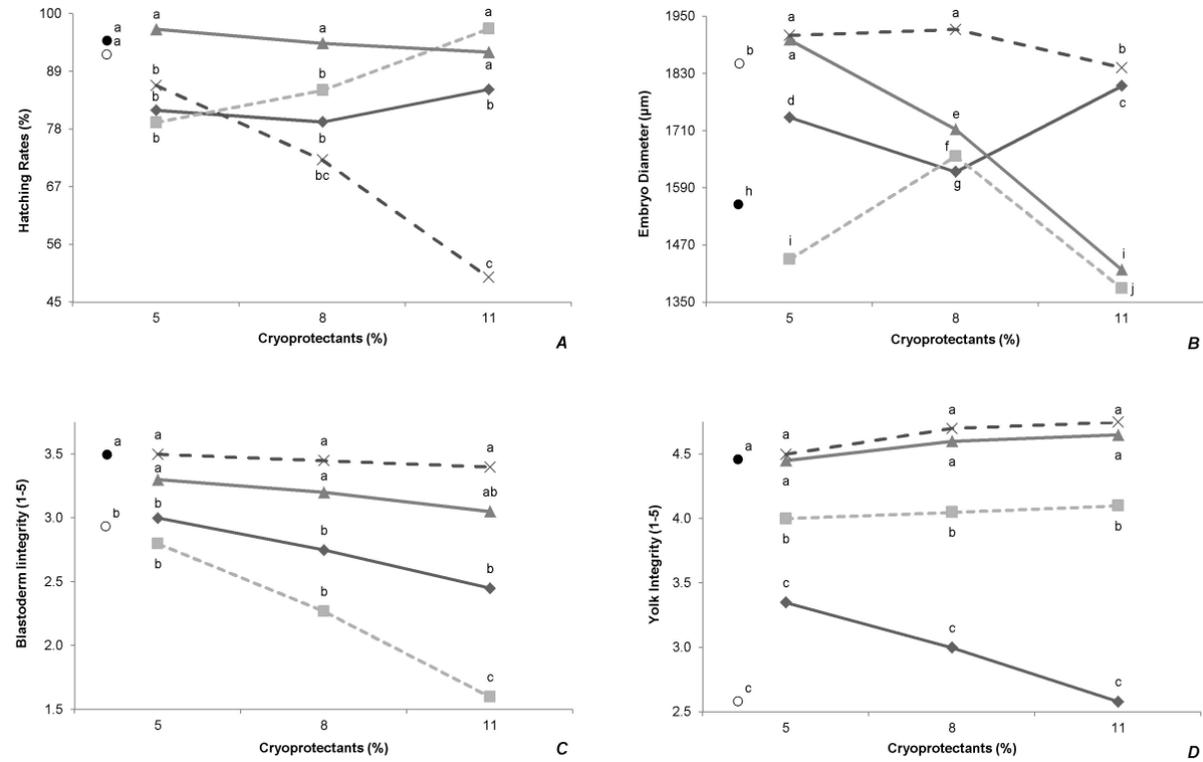


Figure 1 Means of (A) hatching rates, (B) diameters, (C) blastoderm and (D) yolk integrities of 90% epiboly *Salminus brasiliensis* embryos cooled (-2°C/6 h) or not, submitted or not to cryoprotectants solutions. ^{a-j} Means with a common superscript belong to overlapping Bayesian credibility intervals 95%. Standard deviations were omitted for better understanding. ● Control 1 (non-cooled); ○ Control 2 (cooled); ◆ Methanol (non-cooled); ■ DMSO (non-cooled); ▲ Methanol (cooled); × DMSO (cooled).

The following changes were identified to the embryos: irregularity between stratum of blastomeres, rough yolk syncytial layer and yolk globules dispersion. Only the first was considered a potentially lethal change.

The following changes were identified to the embryos: irregularity between stratum of blastomeres, rough yolk syncytial layer and yolk globules dispersion. They were considered severe, moderate and soft, respectively.

Irregularity between stratum of blastomeres was found in a few non-cooled embryos treated with high concentrations of cryoprotectant, especially DMSO (Fig. 2A). The yolk syncytial layer was irregular in a few C2 embryos when compared to C1 and especially in the ones treated with methanol (Fig. 2C). Approximately 40% of C2 embryos and 30% of those treated with any cryoprotectant during cooling had yolk globules dispersed throughout the periphery of the yolk sac close to the syncytial layer (Fig. 2C), which remained in the larvae (Fig. 2D).

Incidentally, a few larvae of *S. brasiliensis* from 8% methanol-treated embryos had underdeveloped tails (Fig. 2E), while cell disarray occurred near the swim bladder in a few embryos immersed in 11% methanol solution (Fig. 2F). In addition, embryos subjected to all cooling treatments had cell migration almost completely inhibited towards the vegetal pole thus delaying hatching by approximately 2.5 h.

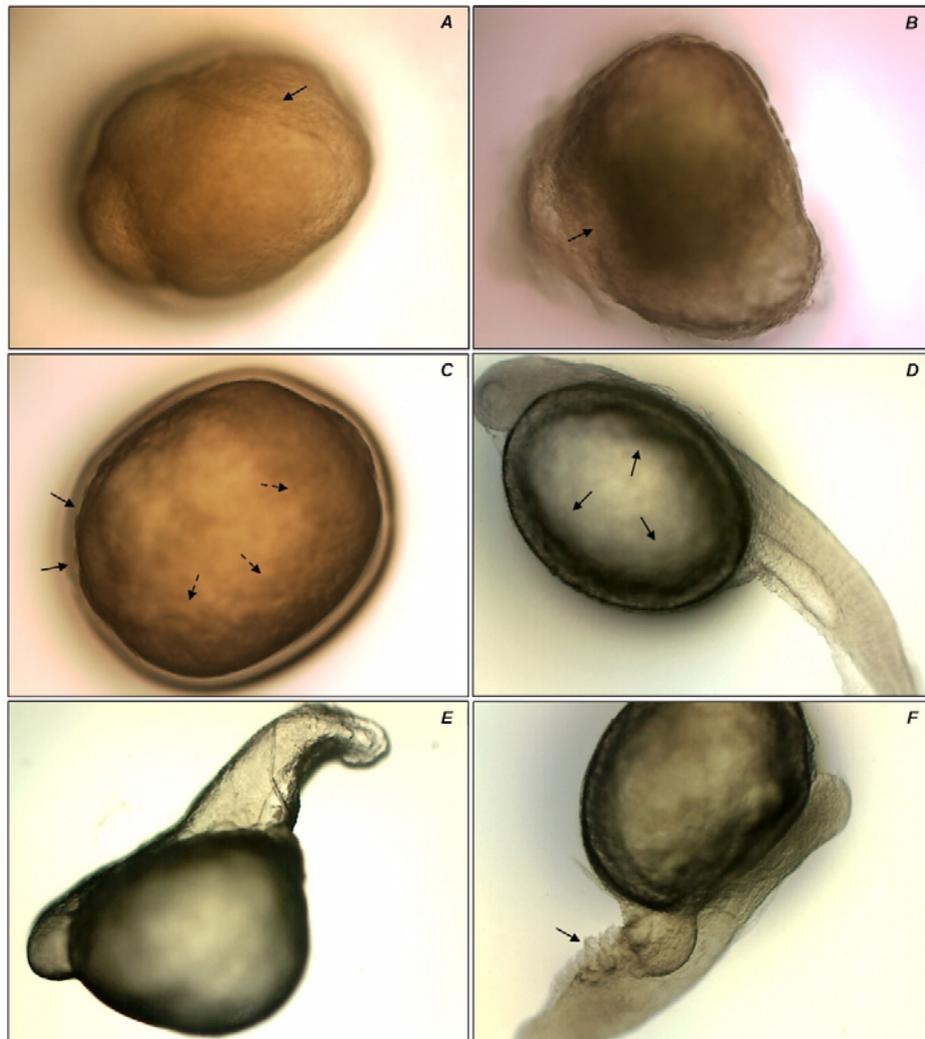


Figure 2 Morphological changes verified to *Salminus brasiliensis* (A, C, D, E and F) and *Brycon orbignyianus* (B) embryos and larvae after cooling at $-2^{\circ}\text{C}/6\text{ h}$. A,B: Discontinuous blastoderm. C: Yolk globules (dashed arrow) around the yolk sac periphery and irregular syncytial yolk layer (solid arrow). D: Yolk globules around the yolk sac in alarva with optic vesicle. E: Larva with short tail. F: Eyeless larva from cooled embryo with near swim bladder cells disarray (arrow). (20 X).

3.1.4 Experiment 4: Freezing

No embryos morphologically intact could be recovered and incubated. Most of them were opaque indicating intracellular ice formation. In general, increased concentration of cryoprotectant provided greater protection, and changes occurred more frequently in blastoderms than in yolks. Further, all treatments had chorion rupture and the use of 5% DMSO resulted in disintegration of both yolk and blastomere in all embryos.

3.2 *Brycon orbignyanus*

3.2.1 Experiment 1: Cold sensibility

Hatching rates of C1 were much higher than in C2 (Table 3). On the other hand, C2 embryos had ED larger than in C1. Incidentally, C1 had the lowest ED among all treatments (Fig. 3B). Analysis of BI and YI revealed similar results for C1 and C2 (Table 3).

Table 3 Hatching rates (HR), embryo diameters (ED) and integrity of blastoderm (BI) and yolk (YI) of *Brycon orbignyanus* embryos used as controls*.

Controls	HR (%)	ED (μm)	BI (1-5)	YI (1-5)
Control 1	86.1 \pm 2.9 ^a	983.5 \pm 1.6 ^b	4.9 \pm 0.5 ^a	5.0 \pm 0.5 ^a
Control 2	40.9 \pm 5.0 ^b	1303.5 \pm 1.6 ^a	3.9 \pm 0.7 ^a	4.8 \pm 1.0 ^a

* Means \pm SD originate from five replicates with 280 embryos each.

^{a,b} Within a column, means with a common superscript belong to overlapping Bayesian credibility intervals 95%.

3.2.2 Experiment 2: Toxicity of cryoprotectants

The highest HR were obtained with 8% and 11% DMSO, surpassing even C1. The lowest means were found when embryos were subjected to 11% methanol (Fig. 3A). Methanol also resulted higher ED than DMSO, except for 11% (Fig. 3B). No difference was found at BI and YI between the cryoprotectants or among their concentrations (Fig. 3C-D).

3.2.3 Experiment 3: Efficiency of cryoprotectants during cooling

Embryos from 5% cryoprotectants exhibited HR similar to C1 and methanol were lowest HR than DMSO at 11% (Fig. 3A). Embryos treated with methanol resulted the highest ED except for these concentration. Methanol was even similar BI (Fig. 3C) and YI (Fig. 3D) to C2. In BI analysis, methanol was always higher than DMSO (Fig. 3C). However, only 8% DMSO significantly reduced YI (Fig. 3D).

Irregularity in the cellular blastoderm and yolk globules dispersion were the only two morphological changes in *B. orbignyanus* embryos, which occurs more frequently on cooled embryos treated with DMSO (Fig. 2B) without morphologically affecting larvae. As in embryos of *S. brasiliensis*, cooling dramatically inhibited epiboly movements (around two hours-delay) without affecting the larval morphology.

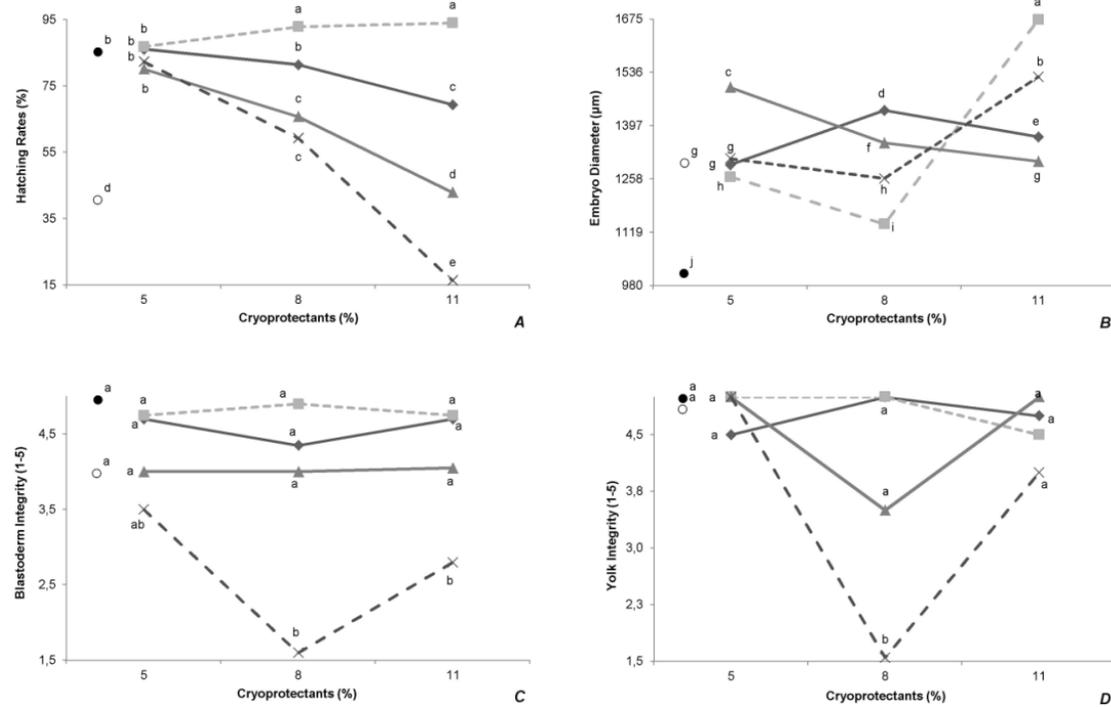


Figure 3 Means of (A) hatching rates, (B) diameters, (C) blastoderm and (D) yolk integrities of 90% epiboly *Brycon orbignyanus* embryos cooled (-2°C/6 h) or not, submitted or not to cryoprotectants solutions. ^{a-j} Means with a common superscript belong to overlapping Bayesian credibility intervals 95%. Standard deviations were omitted for better understanding. ● Control 1 (non-cooled); ○ Control 2 (cooled); ◆ Methanol (non-cooled); ■ DMSO (non-cooled); ▲ Methanol (cooled); ✕ DMSO (cooled).

3.2.4 Experiment 4: Freezing

Only embryos treated with DMSO had rupture of chorionic membrane and yolk syncytial layer. Despite disarray in the cellular blastoderm organization, we found greater similarity when compared to non-cryopreserved embryos and yolk (Fig. 4). This feature occurred more frequently in embryos subjected to methanol regardless of concentration. In addition, translucency was similar to that of C1 embryos and minority of those was opaque.

Three embryos treated with 8% methanol and four with 11% methanol, all morphologically intact, were recovered and incubated. Two of them (11% methanol) developed until neural plate formation.

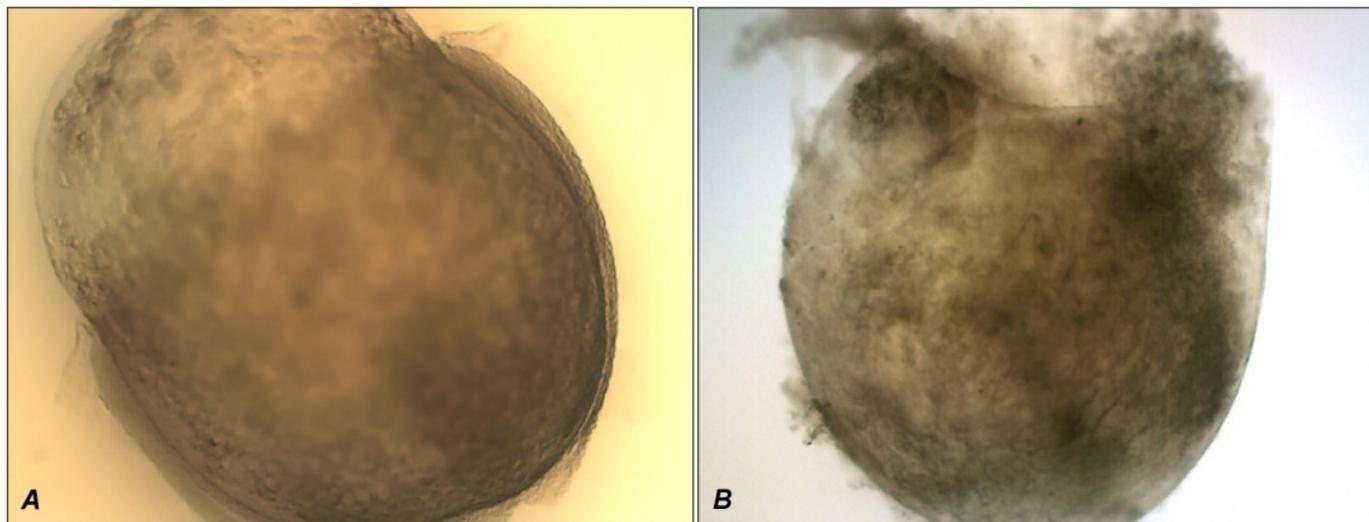


Figure 4 *Brycon orbignyanus* embryos cryopreserved in $N_{2(l)}$ at $-196^{\circ}C/7$ days. A: Embryo treated with methanol; intact blastomeres and yolk. B: Control (without cryoprotectants); syncytial layer breakage, blastoderm and yolk decomposition. (20 X).

4 DISCUSSION

S. brasiliensis embryos showed little cold sensitivity, as HR of C1 was not different than C2. Despite this, a reduction in the morphological quality of cooled embryos in the control group was verified. This may suggest that the changes identified were not able to commit hatchability. It remains doubtful whether such deformities can interfere with larval development.

Whereas *B. orbignyana*, its embryos were more cold-sensitive because HR of non-cooled control group was higher than cooled one. However, BI and YI means of C1 were similar to C2, indicating that other factors, probably molecular, affect embryo viability during cooling. Among these, perhaps the sensitivity to the lack of oxygen supplementation imposed in C2. Importantly, the fact that cooling at -2°C for six hours dramatically inhibited epiboly movements of blastomeres only confirms that the hypoxia produced in embryo microenvironment contributed effectively to decrease metabolism without causing embryo death, in contrast to results reported in other studies [23,24]. As expected, ED of C2 was higher than C1 for both species since the exposure time, 15 min to 6 h, respectively, favored hydration of the embryos.

DMSO showed less toxicity for both species, mainly for highest levels. It caused less yolk changes in *S. brasiliensis* embryos indicating that this compartment should be more labile than the blastoderm. Furthermore, it is noteworthy that the incorporation of cryoprotectant promoted the total maintenance of morphological integrity of the *B. orbignyana* embryos, comparable to that of C1. Observing the diameter of the embryos of experiment 2 (Fig. 1B and 3B), there was an inconsistency between this variable and the type and the level of cryoprotectant. Probably the time during which the assay was carried out was short and the osmotic balance had not yet been reached for both species.

Without considering the concentration of cryoprotectant and species, we found an inverse relationship between embryo diameter and blastoderm and yolk integrity in cooled embryos. However, it did not increase HR, and a relative toxicity of cryoprotectants and their immiscibility in the water-rich content were found, which can be inferred from translucent areas observed in embryos and larvae of *S. brasiliensis* (Fig. 2C-D). Dechoriation [25-27], microinjection of cryoprotectants [28], mRNA transport proteins [29], and ultrasound [2,30] could be alternatives to increase speed of dehydration and cryoprotectant influx.

It is worth noting that both methanol and DMSO preserved embryo morphology in *S. brasiliensis* during cooling; however, methanol proved to be more efficient as it had the highest HR values. Toxic effect of DMSO, especially as its concentration increased, was only observed when combined with temperature reduction probably due to its longer contact with embryos, which also occurred for other migratory specie [31]. According to Kusuda et al. [32], embryo fragility is caused by cell and protein degeneration of nuclear membrane. It is due to dehydration and increasing in salt concentration resulting from contact with cryoprotectants.

Considering that the hatching of C1 and C2 were similar, it could be concluded that the addition of methanol to *S. brasiliensis* embryos was unnecessary. However, the use of any one of cryoprotectants promoted maintaining of morphological integrity, as can be inferred from the comparison between the results of C1 and of the treatments (Fig. 1C-D). In contrast, *B. orbignyana* embryos were not protected from the cold by cryoprotectants with the same effectiveness, since the occurrence of morphological changes was higher for the treated embryos than in the control group C1 (Fig. 3C-D).

Also during cooling, there was water influx into the embryo, as C2 showed ED much higher than that of C1, indicating that temperature reduction increased permeability of chorionic membrane in both species. Embryo diameter

can also be influenced by the stage of embryo development at the moment of cooling. Thus, embryo permeability in *Piaractus mesopotamicus*, a fish species with reproductive characteristics similar to those studied herein was higher in earlier stages, which showed negative correlation with number of viable larvae after cooling in 10% methanol for up to 10 h [33].

Embryos of *B. orbignyana* demonstrated initial decrease in ED as DMSO concentration ranged from 5% to 8%, although significantly increasing when concentration rose to 11%. This could mean that osmotic balance occurs faster as cryoprotectant concentration increases, providing effective protection given the high HR, BI and YI. However, as occurred in embryos of control groups C1 and C2, cooling increased DMSO toxicity thus surpassing its protective capability and determining lower HR than those provided by methanol.

Pereira [34] also found that methanol provided higher mean percentages of viable larvae than DMSO in embryos of another migratory species, *Prochilodus lineatus*, cooled at 4°C. As already occurs in preservation of fish embryonic stem cells [35], combination of DMSO with other non-toxic cryoprotectants (such as methanol) with consequent decrease in its concentration can definitely contribute to survival of embryos and larvae. High HR found in embryos treated with 5% DMSO only reinforce this advantage and could possibly allow for its use even in *S. brasiliensis* embryos.

Damaging effects of DMSO in cooling of both *S. brasiliensis* and *B. orbignyana* embryos could be caused by the high permeability of the chorionic membrane to cryoprotectants when compared with the permeability of other membranes, as found in *Scophthalmus maximus* [36] and in *Leporinus obtusidens* [31]. Total destruction of embryos treated with DMSO during freezing only confirms this behavior.

Morphological changes observed in the blastoderm, syncytial membrane and yolk during cooling are very similar to those observed in embryos of *P. mesopotamicus* [37]. Despite having been observed in scanning electron microscopy and in thawed embryos, the changes basically suggest the destructive action of osmotic pressure exerted by water and cryoprotectants, as well as the direct action of microcrystals formed inside the different types of embryo cells.

Variation between species and protocols of cryopreservation is common. For example, Robles et al. [38] and Cabrera et al. [39] used the same method and solutions to cryopreserve embryos of *S. maximus* and *Sparus aurata*, respectively. Otherwise, the first authors have obtained 49% of viable and intact morphologically embryos while great majority of *S.aurata* embryos were unviable.

Recovery of two viable embryos of *B. orbignyanus* after thawing shows that quick freezing reduces cryo-toxic effect of intracellular solvents. Methanol had already resulted the highest protection during cooling, which was confirmed during freezing. Thus toxicity tests are definitely useful in predicting the behavior of embryos in treatments with different cryoprotectants, but should be conducted under temperature reduction.

Martinez-Páramo et al. [40] found between 25% and 50% of viable cells after vitrification of *Danio rerio* embryos at blastula stage. These survival rates indicate the appropriate cryopreservation of a few cells, although they are considered incompatible with complete embryonic development. Despite the loss of ability to develop, thawed embryos of *S. maximus* manifested some cellular activity. Approximately 50% of the activity of the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase, which is crucial to energy metabolism, was preserved in 5-somite embryos, thus indicating no total cell lysis [41]. Consequently, some intracellular factors are surely not protected by the solutions traditionally used in

trials for cryopreservation of fish embryos. Many of them remain unknown and were certainly prevalent in the failure of freezing protocols, especially for *S. brasiliensis*.

Janik et al. [42] state that syncytial layer is the main barrier to cryoprotectants rather than blastoderm or yolk. However, no embryo of *B. orbignyanus* exhibited marked opacity, indicating that contact time with the solution was enough to allow for cryoprotectant influx, which avoided recrystallization within the yolk sac. Sucrose undoubtedly contributed to avoid mechanical deformation of cell membranes of *B. orbignyanus* embryos caused by water efflux and cryoprotectant influx. However, using another external cryoprotectant or even adding more sucrose could possibly exert the same effect on *S. brasiliensis* embryos.

The cryoprotectants flow through the embryo may be confirmed by high performance liquid chromatography [36,43] in a study in course. Nevertheless, the best development stage for cryopreservation has yet to be defined, as well as intracellular, permeability, and osmoregulation factors, which are essential steps to successful cryopreservation even before new technology replaces traditional methods.

In conclusion, *S. brasiliensis* embryos were less cold-susceptible than *B. orbignyanus* embryos. DMSO was less toxic to embryos from both species but less effective to protect them during cooling mainly at high levels. Nevertheless, recovery and partial development of *B. orbignyanus* embryos after quick freezing indicate that they can be promisingly preserved with methanol addition and the improvement of protocol. Anyway, better understanding of their effects on the compartments and embryonic cells may bring further hopeful results, thus contributing to fish embryo preservation.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was developed with the support of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG) and of Universidade Federal de Lavras.

REFERENCES

- [1] Diwan AD, Ayyappan S, Lal KK, Lakra WS. Cryopreservation of fish gametes and embryos. *Indian J Anim Sci* 2010;80:4:109-124.
- [2] Wang RY, Guan M, Rawson DM, Zhang T. Ultrasound enhanced methanol penetration of zebrafish (*Danio rerio*) embryos measured by permittivity changes using impedance spectroscopy. *Eur Biophys J* 2008;37:1039-44.
- [3] Robles V, Cabrita E, Fletcher GL; Shears MA; King MJ, Herráez MP. Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species, *Theriogenology* 2005;64:1633-46.
- [4] Chen SL, Tian YS. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. *Theriogenology* 2005;63:1207-19.
- [5] Edashige K, Valdez DM, Hara T, Saida N, Seki S, Kasai M. Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos are difficult to cryopreserve by vitrification. *Cryobiology* 2006;53:96-106.
- [6] Buckup PA, Menezes NA, Ghazzi MS. (Ed.). Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil, 2. Ed. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007.
- [7] Rosa RS, Lima FCT. Os peixes ameaçados de extinção. In: Machado ABM, Drummond GM, Paglia AP, editors. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção, Ministério do Meio Ambiente/Fundação Biodiversitas. Brasília, Brazil. 2008, pp. 9-285.
- [8] Murgas LDS, Franciscatto RT, Santos AGO. Sperm evaluation of Piracanjuba fish (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849), after thawing. *Braz J Anim Sci* 2003;32:1810-14.
- [9] Maria AN, Viveiros ATM, Freitas RTF, Oliveira AV. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture* 2006;260:298-306.

- [10] Viveiros ATM, Godinho HP. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiol Biochem* 2009;35:137-50.
- [11] Viveiros ATM, Oliveira AV, Maria AN, Orfao LH, Souza JC. Sensitivity of dourado (*Salminus brasiliensis*) spermatozoa to different cryoprotectant solutions. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2009;61:883-89.
- [12] Viveiros ATM, Isau ZA, Figueiredo HCP, Leite MAS, Maria AN. Gentamycin controls bacterial growth during refrigerated storage of piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, semen 2010;41:57-61.
- [13] Galo JM, Streit DP, Sirol RN, Ribeiro RP, Digmayer M, Andrade VXL, Ebert AR. Spermatid abnormalities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) after cryopreservation. *Braz J Biol* 2011;71:693-99.
- [14] Órfão LH, Nascimento AF, Correa FM, Cosson J, Viveiros ATM. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). *Aquaculture* 2011;311:241-47.
- [15] Guan M, Rawson DM, Zhang T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes by vitrification. *Cryoletters* 2010;31:230-38.
- [16] Tsai S, Rawson DM, Zhang T. Development of cryopreservation protocols for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles using controlled slow cooling. *Theriogenology* 2009;71:1226-33.
- [17] Anil S, Ghafari F, Zampolla T, Rawson DM, Zhang T. Studies on cryoprotectant toxicity to zebrafish (*Danio rerio*) ovarian tissue fragments. *Cryoletters* 2011;32:40-50.
- [18] Billard B., Zhang T. Techniques of genetic resource banking in fish. London: Taylor and Francis Books, 2001.
- [19] Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC. Principles of Laboratory Animal Science, Revised Edition. Elsevier B.V., 2001.

- [20] Nakatani K, Agostinho AA, Baumgartner G, Bialetzki A, Sanches PV, Makrakis MC, Pavanelli CS. Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação [Eggs and larvae of freshwater fish: development and identification manual], Maringá: EDUEM, 2001.
- [21] R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>. 2011.
- [22] Sorensen D, Gianola D. 2002 Likelihood, Bayesian, and MCMC Methods in Quantitative Genetics (Statistics for Biology and Health). New York, NY: Springer 739 pp.
- [23] Garside ET. Effects of oxygen in relation to temperature on the development of embryos of brook trout and rainbow trout. J Fish Res BD Can 1966;23:1121-34.
- [24] Zhang TT, Liu XH, Rawson DM. Effects of methanol and developmental arrest on chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Theriogenology 2003;59:1545-56.
- [25] Cabrita E, Chereguini O, Luna M, De Paz P, Herráez MP. Effect of different treatments on the chorion permeability to DMSO of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture 2003;221:593-604.
- [26] Adams SL, Zhang T, Rawson DM. The effect of external medium composition on membrane water permeability of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Theriogenology 2005;64:1591-1602.
- [27] Ninhaus-Silveira A, Foresti F, De Azevedo A, Agostinho CA, Veríssimo-Silveira R. Cryogenic preservation of embryos of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme ; Prochilodontidae). Zygote 2008;17:45-55.
- [28] Beirão J, Robles V, Herráez MP, Sarasquete C, Dinis MT, Cabrita E. Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. Aquaculture 2006;261:897-903.

- [29] Hagedorn M, Lance SL, Fonseca DM, Kleinhans FW, Artimov D., Fleisher R, Hoque ATMS, Hamilton MB, Pukazhenti BS. Altering Fish embryos with aquaporin-3: an essential step toward successful cryopreservation. *Biol Reprod* 2002;67:961-66.
- [30] Silakes S, Bart AN. Ultrasound enhanced permeation of methanol into zebrafish, *Danio rerio*, embryos. *Aquaculture* 2010;303:71-76.
- [31] Miliorini AB, Paulino MS, Bueno Filho JSS, Murgas LDS, Oliveira AIG. Cooling and freezing of embryos of a reophilic fish, piapara (*Leporinus obtusidens*). *Cryobiology*, 2012; (in submission).
- [32] Kusuda S, Teranishi T, Koide N. Cryopreservation of chum salmon blastomeres by the straw method. *Cryobiology* 2002;45:60-67.
- [33] Lopes TS, Romagosa E, Streit Jr. DP, Ribeiro RP, Digmayer M. Cooling of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos at various stages of development for 6 or 10 hours. *Theriogenology* 2011;75:570-76.
- [34] Pereira GJM, 2010. Desempenho reprodutivo e resfriamento de embriões de peixes nativas mantidas em cativeiro. DSc Thesis, Federal University of Lavras, Brazil, 147 pp.
- [35] Dash SN, Routray P, Dash C, Guru BC, Swain P, Sarangi N. Use of the non-toxic cryoprotectant trehalose enhances recovery and function of fish embryonic stem cells following cryogenic storage. *Curr Stem Cell Res Ther* 2008;3:277-87.
- [36] Cabrita E, Robles V, Chereguini O, de Paz P, Anel L, Herráez MP. Dimethyl sulfoxide influx in turbot embryos exposed to a vitrification protocol, *Theriogenology* 2003;60:463-73.
- [37] Fornari DC, Ribeiro RP, Streit DP, Vargas L, Barrero NM, De Moraes GV. Freezing injuries in the embryos of *Piaractus mesopotamicus*. *Zygote* 2010;1-6.
- [38] Robles V, Cabrita, E, Real M, Alvarez R, Herraéz MP. Vitrification of turbot embryos: preliminary assays. *Cryobiology* 2003;47:30-9.

- [39] Cabrita E, Robles V, Wallace JC, Sarasquete MC, Herraéz MP. Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. *Aquaculture* 2006;251:245-55.
- [40] Martínez-Páramo S, Barbosa V, Pérez-Cerezales S, Robles V, Herraéz MP. Cryoprotective effects of antifreeze proteins delivered into zebrafish embryos. *Cryobiology* 2009;58:128-133.
- [41] Robles V, Cabrita E, De Paz P, Cuñado S, Anel L, Herraéz MP. 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* 2004;61:1367-79.
- [42] Janik M, Kleinhans FW, Hagedorn M. Overcoming a permeability barrier by microinjecting cryoprotectants into zebrafish embryos (*Brachydanio rerio*). *Cryobiology* 2000;41:25-34.
- [43] Routray P, Suzuki T, Strüssmann CA, Takai R. Factors affecting the uptake of DMSO by the eggs and embryos of medaka, *Oryzias latipes*, *Theriogenology* 2002;58:1483-96.

**ARTIGO 2 Cooling and freezing of embryos of a reophilic fish, Piapara
(*Leporinus obtusidens*)**

Aléssio B. Miliorini¹, Michelle S. Paulino, Júlio S. de S. B. Filho,
Luis D. S. Murgas, Antonio I. Gomes de Oliveira

¹ Corresponding author. Tel.: 55 (35) 3829-1122; fax: 55 (35) 3829-1122.
E-mail address: amiliorini@dmv.ufla.br (Aléssio Batista Miliorini).

ABSTRACT

The cryopreservation of gametes and embryos of aquatic species offers many benefits. However, so far no protocol was able to obtain viable embryos after freezing under the desired efficiency and reproducibility. Therefore, the objectives of this research were to evaluate the effects of cooling and freezing of Piapara (*Leporinus obtusidens*). Embryos from four pairs were used. They were immersed in solutions containing methanol or DMSO at 5, 8 or 11% under cooling (-2 °C) or not. No cryoprotectant was added to the control groups that were incubated at room temperature or cooled. Another group of embryos was frozen in LN₂ after bathing in the same cooling solutions. *L. obtusidens* embryos demonstrated reasonable sensitivity to the cold. However, the addition of DMSO attenuated the interference that the cooling process caused on the hatching. The methanol and DMSO resulted low toxicity. The methanol was not able to permeate the embryonic membranes with the same efficiency during cooling process. Most of the frozen embryos from control group presented total disintegration of both the yolk and blastoderm and ice crystals formation, as well as those treated with 11% DMSO. Five embryos treated with 11% methanol were recovered and incubated, and four of them developed up to the formation of the two-first-somites. These results may mean that cryopreservation of *L. obtusidens* embryos by rapid freezing is promising, but it is necessary to improve knowledge about their biophysical characteristics to explore the potential of the procedures used here.

Keywords: Blastoderm. Cool storage. Cryopreservation. Dimethyl sulfoxide. Eggs. Methanol. Yolk.

RESUMO

A criopreservação de gametas e embriões de peixes oferece inúmeros benefícios. Contudo, até o momento nenhum protocolo foi capaz de obter embriões viáveis após o congelamento com a eficiência e a reprodutibilidade desejadas. Portanto, os objetivos desta pesquisa foram avaliar os efeitos do resfriamento e do congelamento sobre os embriões de *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1837). Um grupo de embriões provenientes de quatro casais de cada espécie foi imerso em soluções contendo 5%, 8%, 11% de metanol ou DMSO e resfriados (-2° C) ou não. Outros dois grupos foram incubados sem crioprotetores à temperatura ambiente (Controle 1- C1) ou resfriados (Controle 2-C2). Outros embriões foram congelados em LN₂ após o banho nas mesmas soluções utilizadas no resfriamento. Os embriões de *L. obtusidens* demonstraram razoável sensibilidade ao frio. Entretanto, a adição de DMSO atenuou a interferência que o processo de resfriamento provocou sobre a eclodibilidade. Ambos os crioprotetores foram pouco tóxicos aos embriões, mas o metanol não permeou as membranas embrionárias com a mesma eficiência durante o resfriamento. A maioria dos embriões congelados do grupo controle apresentou desintegração total tanto do vitelo quanto da blastoderme, além de formação de cristais de gelo. Estas alterações também foram exibidas pelos embriões tratados com DMSO 11%. Cinco embriões submetidos ao metanol 11% foram recuperados íntegros e incubados, e quatro deles se desenvolveram até a formação dos dois primeiros somitos. Estes resultados podem indicar que a criopreservação dos embriões de *L. obtusidens* pelo congelamento rápido é promissora, mas é necessário fomentar o conhecimento acerca de suas características biofísicas a fim de se explorar o potencial dos procedimentos utilizados neste estudo.

Palavras-chave: Blastoderme. Preservação pelo frio. Criopreservação. Dimetilsulfóxido. Ovos. Metanol. Vitelo.

1 INTRODUCTION

The cryopreservation of gametes and embryos from aquatic species offers many benefits to the biodiversity conservation and aquaculture fields. It provides flexibility into the management of breeding and preservation of genetic diversity [9]. Additionally, the reproductive material of fish also plays a significant role in human genetic studies [39].

The Piapara (*Leporinus obtusidens* - Valenciennes, 1837) is a migratory omnivorous species, which occurs in the watersheds of the rivers Paraná, La Plata and São Francisco [14], in South America. The species have aquaculture potential [4] and for fishing practice [38]. As well as for the other native species, it suffers substantially with predatory overfishing practice and with changes in natural habitat, such as construction of dams and pollution. As consequence, there was a reduction of their population in the last decades [37].

Advanced studies about cryopreservation of gametes and embryos from aquatic organisms are modest compared to research results about mammals. For instance, sperm of more than 200 species of fish [9], including *L. obtusidens* and other migratory species have been successfully frozen [15,28,37,42]. On the other hand, the success of the preservation of embryos has been limited to few studies [7,34], without the expected reproducibility though.

The cryopreservation of fish embryos is a difficult process because of its large size, low membrane permeability and great sensitivity to the cold and cryoprotectant solutions [43]. Oocytes [17] and ovarian follicles [1,40] of fish are more easily freezable for having smaller dimensions, more permeable membranes and less sensitivity to temperature decrease, as well as the lower complexity of the membranes. Interestingly, cryopreservation of oocytes from reophilic species has not been studied.

Many cryoprotectants have been utilized in embryos cryopreservation, as dimethyl sulfoxide, methanol, glycerol, propylene glycol, ethylene glycol and propanediol [3]. Both the type and concentration of cryoprotectant are species-specific and the first two have appeared to be more appropriate for most species embryos.

Thus, the objectives were to test embryos sensibility to cold, the cryoprotectant toxicity and its efficiency to protect *Leporinus obtusidens* embryos from injuries during cooling and freezing.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Embryos

The study was carried out on the Environmental Unit of Energy Company of Minas Gerais (CEMIG) in Itutinga, (21°17'53"S; 44°39'28"W), Minas Gerais, Brazil, during the spawning season (January and February, 2011).

Embryos were from two-year-old *Leporinus obtusidens* specimens. They were kept in earth tanks at 0.3 kg/m² density since its larviculture. Already adults, four couples were selected because released gametes under pressure of the coelomic cavity wall. They were removed from earth tanks and transferred to aquariums (males and females segregated). Males weighed 755 ± 21 g and females weighed 887 ± 14 g.

Females underwent hormonal induction with carp pituitary extract (CPE) in two intramuscular applications of 0.5 and 5.0 mg CPE per kg of fish in a twelve-hour interval. Males underwent only second dose. Breeders released gametes after 220-225 hours-degree. Immediately after fertilization, the eggs were transferred to funnel type incubation units (1 progeny = 1 incubation unit) and incubated in a flow-through system at 27 ± 1.1 °C. All fish were handled in compliance with published guidelines for animal experimentation [17].

The embryonic development was monitored in a stereomicroscope every 30 min by evaluating a sample of 100 embryos at a time. When about 80% of them reached 80% epiboly, four experiments were conducted (Table 1).

Table 1 Summary of experimental design for cooling and freezing of *Leporinus obtusidens* embryos.

Experiment	Treatment	PBS (%)	Methanol (%)	DMSO (%)	Sucrose (M)	Steps
1. Cold sensibility	Control 1	89.1	-	-	0.5	1. Bath 1 (25°C/10 min) 2. Bath 2 (4°C/5 min) 3. Acclimation 4. Hatching
	Control 2	89.1	-	-	0.5	1. Bath 1 (25°C/10 min) 2. Bath 2 (4°C/5 min) 3. Cooling (-2°C/6 h) 4. Acclimation 5. Hatching
2. Toxicity of Cryoprotectants	1	84.1	5 (0.12M)	-	0.5	
	2	81.1	8 (0.20 M)	-	0.5	
	3	78.1	11 (0.27 M)	-	0.5	1. Bath 1 (25°C/10 min) 2. Bath 2 (4°C/5 min) 3. Acclimation 4. Hatching
	4	84.1	-	5 (0.07M)	0.5	
	5	81.1	-	8 (0.11 M)	0.5	
	6	78.1	-	11 (0.16 M)	0.5	
3. Efficiency of cryoprotectants and protocol resistance	1	84.1	5	-	0.5	
	2	81.1	8	-	0.5	
	3	78.1	11	-	0.5	1. Bath 1 (25°C/10 min) 2. Bath 2 (4°C/5 min) 3. Cooling (-2°C/6 h) 4. Acclimation 5. Hatching
	4	84.1	-	5	0.5	
	5	81.1	-	8	0.5	
	6	78.1	-	11	0.5	

“Table 1, conclusion”

Experiment	Treatment	PBS (%)	Methanol (%)	DMSO (%)	Sucrose (M)	Steps
4. Freezing	1	84.1	5	-	0.5	
	2	81.1	8	-	0.5	
	3	78.1	11	-	0.5	
	4	84.1	-	5	0.5	
	5	81.1	-	8	0.5	
	6	78.1	-	11	0.5	
	Control	89.1	-	-	0.5	

1. Bath 1 (4°C/10 min) 2. Bath 2 (2°C/5 min) 3. Setting in cryotubes 4. Pre-freezing at -170°C (-35.6°C/min) in N₂ vapor 5. Rapid-freezing at -196°C/7 d 6. Thawing (60°C/8 s)

2.2 Experiment 1: Cold sensibility

Around 2800 embryos were taken from funnel type incubators using a plastic sieve. After water was drained, half (Control 1 - C1) was immersed in glass beakers at room temperature (25 °C) for 10 min in a medium containing phosphate buffered saline (PBS - NaCl 8.0 g/L, KCl 0.2 g/L, Na₂HPO₄ 1.44 g/L, K₂HPO₄ 0.24 g/L), pH 7.41, and sucrose 0.5 M. Afterwards, the embryos were transferred to beakers with the same solution at 4 °C for 5 min. The embryos were then acclimated in incubation water for 3 min. They were distributed among five experimental incubators 700 mL capacity. Experimental incubation process is going to be explained in section 2.5.

The other half (Control 2 - C2) was submitted at the same bath scheme of C1. However, at the end of the last bath, embryos were cooled as described in section 2.5. Finally, the embryos were drained again and distributed among five incubators after acclimation.

2.3 Experiment 2: Toxicity of cryoprotectants

For cryoprotectants toxicity experiment, around 8400 embryos were utilized. They were immersed in glass beakers containing one of the following treatments (1400 embryos per treatment) at room temperature (25 °C) for 10 min (PBS was used as base for all solutions):

- 5% Methanol plus 0.5 M sucrose;
- 8% Methanol plus 0.5 M sucrose;
- 11% Methanol plus 0.5 M sucrose;
- 5% Dimethyl sulfoxide (DMSO) plus 0.5 M sucrose;
- 8% DMSO plus 0.5 M sucrose or;
- 11% DMSO plus 0.5 M sucrose.

Afterwards, the embryos were transferred to beakers with the same solutions at 4 °C for 5 min. As a last step, the embryos were drained and taken acclimated to the incubator units (also five per treatment).

2.4 Experiment 3: Efficiency of cryoprotectants during cooling

The number of embryos and bath scheme were the same for experiment 2. The difference is that after the last immersion, the embryos were taken to refrigerator immersed in the treatment mediums. Their temperature was monitored and the cooling rate was -0.1 °C/min. They were kept there for six hours from the time when the medium temperature reached -2 °C. Then, the embryos were drained again and distributed among five incubators after acclimation.

2.5 Incubation and hatching

Incubation was performed in a flow-through system at 27 ± 1.3 °C. Each experimental incubator was a replicate. The embryos from experiments 1 and 2 remained there until hatching. In turn, the embryos from experiment 3 were incubated by the time that C2 embryos spent to hatch.

2.6 Evaluation of hatching rate and larval viability

After completion of embryos development (around 19 h after fertilization for C1), the total number of larvae (TL) was determined from each

incubator. The hatching rate (HR) of an incubation unit was calculated by dividing TL by 280 and multiplying by 100.

In addition, around 100 larvae from a pool of all incubators per treatment were fixed in buffered formaldehyde [30] and morphologically analyzed taking into account dimensions and external characteristics. They were compared to the non-cooled control group. For both, a light microscope phase contrast with a 20X objective was used. It was equipped with digital camera in order to capture images, which were analyzed with the software Motic Images Plus 2.0[®].

2.7 Experiment 4: Freezing

Three hundred embryos were submitted to the same treatments of experiments 2 and 3; however, temperatures of first and second baths were respectively 4 °C and 2 °C. Another group (control) of 300 embryos was immersed in PBS and sucrose 0.5 M following the same steps of the treated ones.

At the end of the last bath, the embryos of both groups were placed into 2.0 mL cryotubes (8 at 10 embryos per tube) and taken to a vapor cylinder *dry-shipper*. Freezing rate was approximately -35.6 °C/min and vessel temperature was stabilized at about -170 °C after 330 sec. After this period of time, the embryos were submerged in LN₂ (-196 °C) in another cylinder and stored for seven days before thawing.

Rapid thawing was proceeded by immersion of the cryotubes in water at 60 °C for 8 sec. Then, the embryos were evaluated for their opacity and only translucent ones (indicating no crystal ice formation) were taken to experimental incubators and monitored until hatching or death.

2.8 Morphometric and morphological analysis of embryos

A sample of embryos from each treatment ($n = 100$) was immediately fixed in buffered formaldehyde before incubation (experiments 1-3), or after thawing (experiment 4). The fixed embryos were analyzed by light microscope phase contrast using a 20X objective and images were captured with the same software used in the analysis of larvae.

The variables from C1 and C2 were used for comparison with those of experiment 2 and the others in each cooling treatment, as well as their morphological features.

2.9 Statistical analysis

2.9.1 Bayesian hierarchical models

For the HR a generalized linear mixed model was fitted based on a logistic link on the linear predictor using “glmer()” library from R (R Development Core Team, 2011). This was used as a proxy of a Bayesian analysis using non-informative priors to treatment means.

2.9.2 Preliminary analysis

A preliminary analysis was carried out to infer treatment means representing all combinations of factor levels (fixed effects). The full sib family represented in each sample was taken as a random effect (with standard normal distribution).

2.9.3 Regression analysis

A regression model with a common intercept and up to the quadratic term on concentration was fitted to the factorial structure of the 14 treatments (temperature x cryoprotectant x concentration + C1 and C2). The simplest models which deviation of regression lines are not relevant where chosen. Only best models are presented.

2.9.4 Specific models linking linear predictors and actual responses

In all cases, liability was assumed to be normally distributed. For the hatching rate, a binomial model with logistic link was used. For inference on treatment differences at different concentrations, 95% credibility intervals were worked out for the regression lines. Limits on those intervals were used for informal hypothesis testing to depict letters following estimates of treatment means.

3 RESULTS

3.1 Experiment 1: Cold sensibility and toxicity of cryoprotectants

The HR from C1 ($93.4 \pm 3.6\%$) was higher than those from C2 ($78.7 \pm 4.2\%$), demonstrating high sensibility to cold (Fig. 1). However, there was no difference between ED from C1 ($1250.8 \pm 1.9 \mu\text{m}$) and C2 ($1264.3 \pm 1.9 \mu\text{m}$) (Fig. 2).

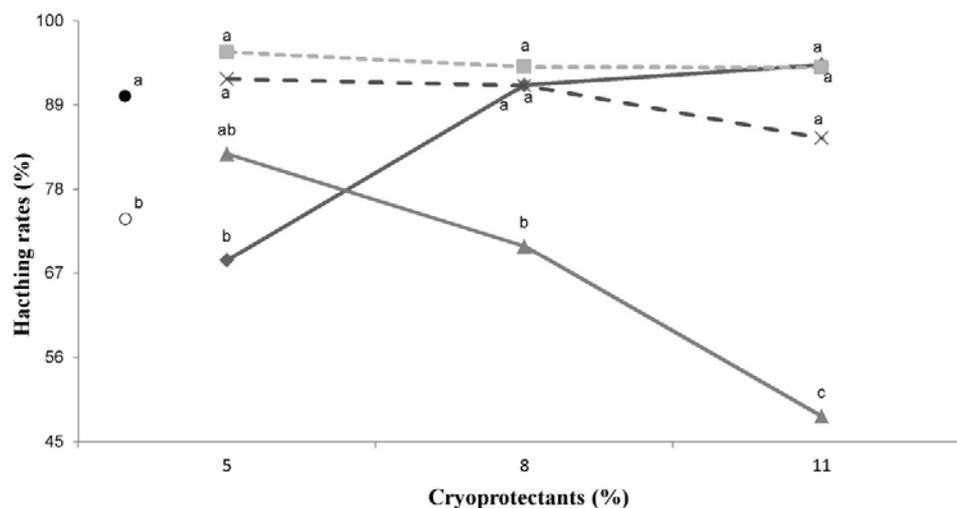


Figure 1 Means of hatching rates of 80% epiboly *Leporinus obtusidens* embryos cooled ($-2^{\circ}\text{C} / 6\text{ h}$) or not, or not to cryoprotectants submitted solutions. ^{a-c} Means with a common superscript belong to overlapping Bayesian credibility intervals 95%. Standard deviations were omitted for better understanding. ● Control 1 (non-cooled); ○ Control 2 (cooled); ◆ Methanol (non-cooled); ■ DMSO (non-cooled); ▲ Methanol (cooled); × DMSO (cooled).

3.2 Experiment 2: Toxicity of cryoprotectants

Hatching was not different between cryoprotectants except for 5% methanol (Fig. 1). DMSO was higher ED for highest levels (Fig. 2).

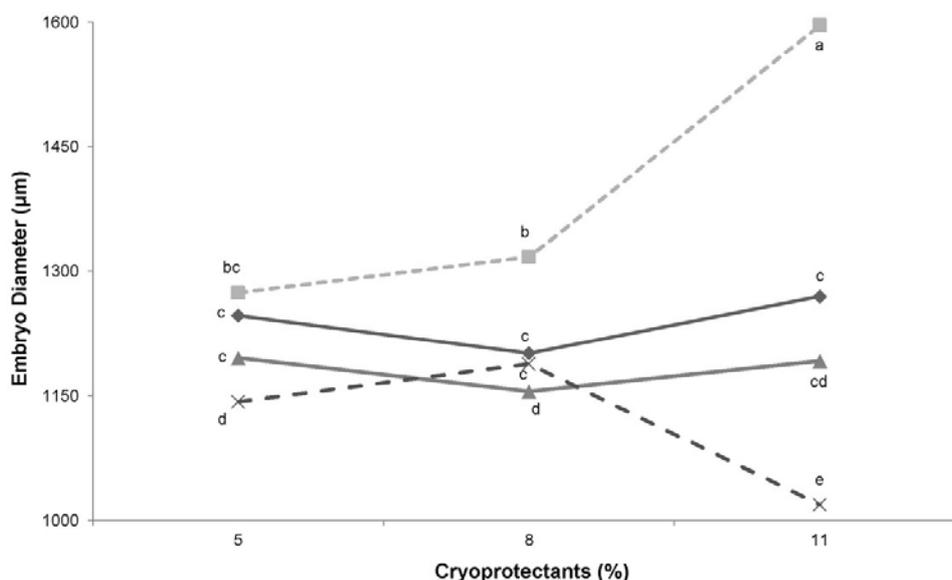


Figure 2 Means of embryo diameter of 80% epiboly *Leporinus obtusidens* embryos cooled ($-2^{\circ}\text{C} / 6\text{ h}$) or not, submitted or not to cryoprotectants solutions. ^{a-c} Means with a common superscript belong to overlapping Bayesian credibility intervals 95%. Standard deviations were omitted for better understanding. ● Control 1 (non-cooled); ○ Control 2 (cooled); ◆ Methanol (non-cooled); ■ DMSO (non-cooled); ▲ Methanol (cooled); × DMSO (cooled).

3.2.1 Experiment 3: Efficiency of cryoprotectants during cooling

DMSO was higher HR regardless of the concentration (Fig. 1) and only at 11% ED was lower (Fig. 2). No one of the treatments, either being under cooling or not, produced any morphological abnormality in embryos (Fig. 3A). However, some larvae whose embryos were submerged in 11% methanol solution showed a cell disarrayed near the bladder (Fig. 3C). Worse still, the majority of larvae treated with 11% DMSO had shortening of the tail, and stopped its development even before the somitogenesis (Fig. 3D).

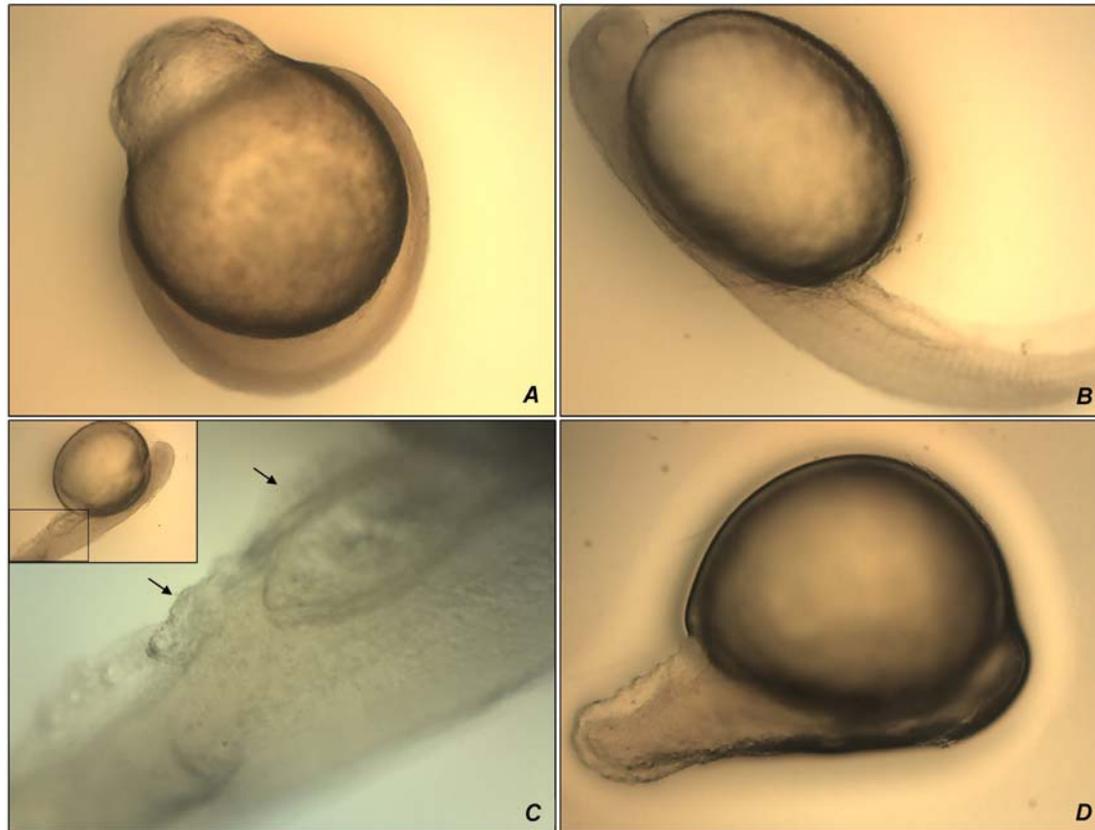


Figure 3 Embryo and larvae of *Leporinus obtusidens* after cooling at -2°C / 6 h. A: Normal embryo at 80% epiboly. B: Normal larva. C: Larva with swim bladder cells near breakdown (arrows). D: Larva with short tail. (20 X).

It was also observed that embryos subjected to cooling, regardless of treatment, had an almost total paralysis of cell migration toward the vegetal pole, delaying the onset at approximately two hours.

3.3 Experiment 4: Freezing

The majority of embryos in the control group suffered total disintegration of both blastoderm and yolk as well as those treated with 11% DMSO (Fig. 4B). Although they have not disintegrated, most of the embryos in the control group and those treated with lower cryoprotectants levels showed a whitish appearance. They showed disorganization of the blastoderm and disaggregation of blastomeres (Fig. 4A), without rupture of the chorionic layer or changes on the yolk. Additionally, most of the embryos treated with low concentrations (5 and 8%) of any one of cryoprotectants showed syncytial yolk layer rupture (Fig. 4C), with no significant damage to the blastoderm.

Five embryos treated with 11% methanol, all morphologically intact, were recovered and incubated (Fig. 4D), four of them developed until the formation of the first-two-somites.

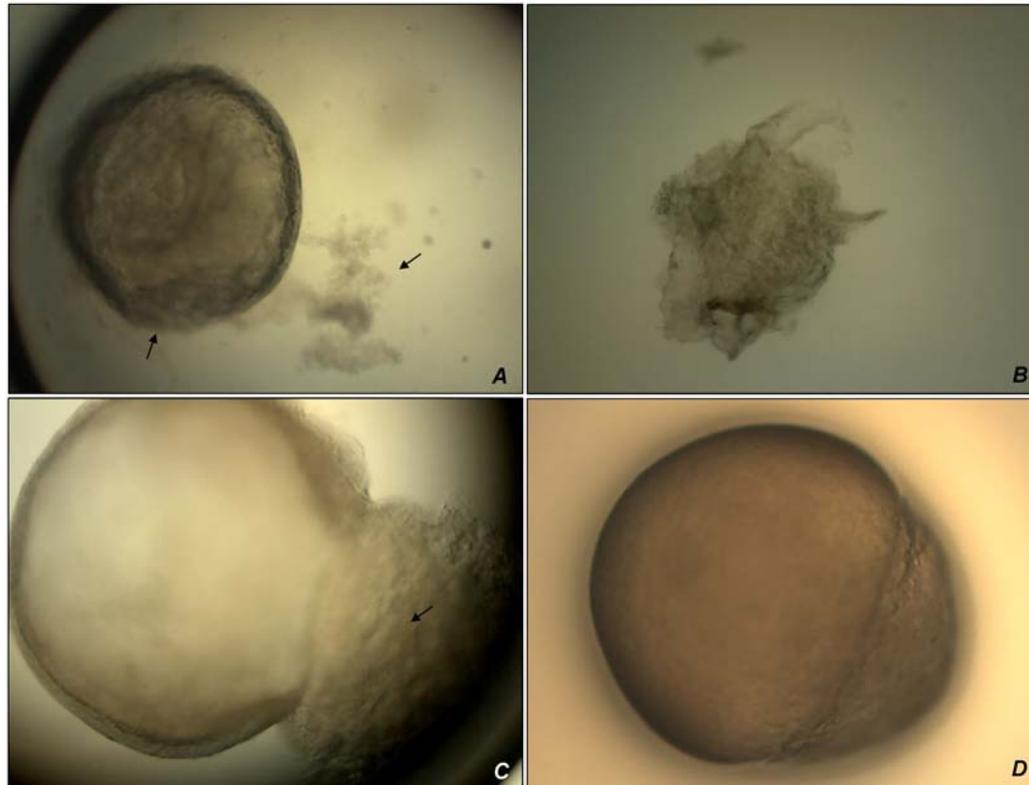


Figure 4 Embryos of *Leporinus obtusidens* after freezing at -196°C / 7 days. A: Embryo without cryoprotectant addition (control). Note blastomeres disruption (arrow) and yolk integrity. B: Disintegrated embryo treated with 11% DMSO. C: Syncytial layer breakage and overflow yolk mass (arrow). D: Intact embryo treated with 11% methanol. (20 X).

4 DISCUSSION

The *L. obtusidens* embryos demonstrated reasonable sensitivity to cold, since the HR mean results were lower than those of C1 to C2. However, the addition of DMSO attenuated the interference that the cooling process had on the hatchability, because DMSO means were highest at all levels during cooling. The addition of a cryoprotectant may somehow interfere with the aerobic metabolism being that there was no oxygen supplementation through the cryoprotectant during cooling. The stoppage of migration of the *L. obtusidens* blastomeres confirms that hypoxia produced in the microenvironment of the embryos contributed to the metabolism decrease without causing its death, in contrast to what has been found for other species [16,46].

The methanol and DMSO were slightly toxic to the *L. obtusidens* embryos because at room temperature the HR means of both of them were similar to the control group, under the same conditions. Somehow, the HR mean of the cooled embryos group treated with DMSO were higher than the cooled embryos immersed in methanol, providing evidence that either this cryoprotectant was more toxic as the contact time was longer with the embryos or its influence by embryonic membranes was insufficient to protect cells and tissues. Exposure of zebrafish (*Danio rerio*) embryos at different cryoprotectants during 30 min revealed that DMSO was more toxic than methanol [20]. However, when the contact time increased to 48 h, an inversion occurred and survival rate of the embryos groups treated with DMSO was higher. Incidentally, 30 min and 10% were time and maximum concentrations of cryoprotectants with no signs of cryotoxicity to embryos of red sea bream (*Pagrus major*) [8].

By observing the ED means (Fig. 2), it is possible to conclude that there was a higher initial influx of DMSO through the chorionic membrane and that,

as the contact time with the embryos was also higher (which occurred during cooling process), most of water contained in the embryo has been lost to the environment and been replaced osmotically by DMSO. This explains why the HR means of cryoprotectant were higher after cooling, and is reinforced by the fact that the embryo diameter has remained virtually unchanged even with increasing concentrations of methanol. Therefore, this cryoprotectant has not been more toxic than DMSO, it only did not permeate the *L. obtusidens* embryonic membranes with the same efficiency. The flow of cryoprotectants may be confirmed by high performance liquid chromatography [5,36] in a study in course.

The lower permeability of the membranes, especially chorionic, to methanol did not prevent however, that this substance exerted their protective ability, after all, most of the larvae treated with DMSO 11% had tail underdevelopment and early death. Instead, only a few cooled embryos treated with methanol, at the same concentration, showed larvae with morphological abnormalities.

The results obtained for the cooling experiment and its preliminary interpretation corroborate to the findings for the freezing experiment. The fact that 11% DMSO has also promoted the total disintegration of both the blastoderm and the yolk of the majority of frozen embryos confirms its potential toxicity on the *L. obtusidens* embryos. The methanol and DMSO were chosen for this experiment because they presented in previous tests the best results compared to other cryoprotectants such as ethylene glycol, glycerol and propylene glycol. However, some authors have found that the combination of the cryoprotectant in vitrificant solution provides different results from those used in the toxicity tests in which the components are tested individually [6,47]. In this way, if other tests were carried out mixing the DMSO and methanol together and / or with other intra or extracellular agents, it would be able to

confirm their potential toxicity found in this study and to substantially improve the degree of permeability of various embryonic membranes, allowing the best survival results hatching or even after thawing.

Studies on cooling and freezing of embryos of reophilic species such as *L. obtusidens* are scarce. As examples, it can be cited studies with *Colossoma macropomum* [13], *Prochilodus lineatus* [31,32] and *Piaractus mesopotamicus* [12,24]. In general summary, it was identified lesions similar to those reported in this work for embryos treated with a cryoprotectant, including disorganization and rupture of the syncytium and chorionic membrane, always without preservation of embryo viability.

The recovery of five morphologically intact embryos and the resumed growth of, albeit short, four of them, confirm that the preservation of *L. obtusidens* embryos through rapid freezing is possible and perhaps it is the best option, as well as for other species [19,22,29]. Nevertheless it is unclear if the protocol can present the expected repeatability. According to Diwan et al. [9], there is a high degree of variability in the implementation and in the results of freezing protocols and vitrification of embryos between species and even within the same species. As an example, it may be mentioned the recovery of twenty *Paralichthys olivaceus* embryos after vitrification [7]. Some studies have been subsequently developed using the same protocol [10,11], but without the same success.

Most of the *L. obtusidens* frozen embryos from the control group non disintegrated and those treated with lower concentrations of cryoprotectants showed a whitish appearance. According to Zhang and Rawson [45], the presence of opaque embryos after thawing indicates the formation of intracellular ice and, as observed by Fornari et al. [12] and Ninhaus-Silveira et al. [31], the embryos presented a good conformation, despite of the lesions illustrated in Fig. 4. Finally, it can be concluded that the concentration of

intraembryonic cryoprotectants was insufficient in smaller concentrations, to prevent crystallization of the water present in the calf and the blastoderm.

The inefficiency in obtaining consistent results with traditional cryoprotectants and protocols has led some researchers to test agents [18,21,25,26,27,35,44] and alternative techniques of permeabilizing the membranes [2,23,35]. The use of antifreeze proteins and standard microinjection of cryoprotectants and synthetics should be assessed to *L. obtusidens* and species with similar breeding habits, but through the recovery of intact embryos and the absence of other studies about the embryos cryopreservation of the same species, it is necessary to enhance the prior knowledge of their molecular characteristics and explore the potential of the procedures used herein.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was developed with the support of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG) and of Universidade Federal de Lavras.

REFERENCES

- Diwan, A. D.; Ayyapp[1] S. Anil, F. Ghafari, T. Zampolla, D.M. Rawson, T. Zhang, Studies on cryoprotectant toxicity to zebrafish (*Danio rerio*) ovarian tissue fragments, *Cryoletters* 32 (2011) 40-50.
- [2] J. Beirão, V. Robles, M.P. Herráez, C. Sarasquete, M.T. Dinis, E.Cabrita, Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos, *Aquaculture* 261 (2006) 897-903.
- [3] B. Billard, T. Zhang, Techniques of genetic resource banking in fish, Taylor and Francis Books, London, 2001.
- [4] P.A. Buckup, N.A. Menezes, M.S. Ghazzi (Eds.), Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil, second ed. Rio de Janeiro, Museu Nacional, 2007. 195 p.
- [5] E. Cabrita, V. Robles, O. Chereguini, P. de Paz, L. Anel, M.P. Herráez, Dimethyl sulfoxide influx in turbot embryos exposed to a vitrification protocol, *Theriogenology* 60 (2003) 463-473.
- [6] E. Cabrita, V. Robles, J.C. Wallace, M.C. Sarasquete, M.P. Herráez, Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos, *Aquaculture* 251 (2006) 245-255.
- [7] S.L. Chen, Y.S. Tian, Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification, *Theriogenology* 63 (2005) 1207-1219.

- [8] F.H. Ding, Z.Z. Xiao, J. Li, Preliminary studies on the vitrification of red sea bream (*Pagrus major*) embryos, *Theriogenology* 68 (2007) 702-708.
- [9] A.D. Diwan, S. Ayyappan, K.K. Lal, W.S. Lakra, Cryopreservation of fish gametes and embryos, *Indian J. Anim. Sci.* 80 (2010) 109-124.
- [10] K. Edashige, D.M. Valdez, T.Hara, N. Saida, S. Seki, M.Kasai, Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos are difficult to cryopreserve by vitrification, *Cryobiology* 53 (2006) 96-106.
- [11] K.A. El-Battawy, O. Linhart, Preliminary Studies on Cryopreservation of Common Tench (*Tinca tinca*) Embryos (Work in progress), *Reprod Dom Anim* 44 (2009) 718-723.
- [12] D.C. Fornari, R.P. Ribeiro, D.P. Streit, L. Vargas, N.M. Barrero, G.V. De Moraes, Freezing injuries in the embryos of *Piaractus mesopotamicus*, *Zygote* (2010) 1-6.
- [13] D.C. Fornari, R.P. Ribeiro, D.P. Streit Jr., J.M. Galo, E.K. Resende, R.V. Barreto, G.V. Moraes, L. Vargas, Toxidez dos crioprotetores utilizados na vitrificação de embriões de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), 2011, In: Conferência Latinoamericana Sobre Cultivo de Peixes Nativos, 3.; Congresso Brasileiro de Produção de Peixes Nativos, 3., 2011, Lavras. Anais... Lavras: UFLA, 2011.
- [14] R. Froese, D. Pauly, FishBase: World Wide Web electronic publication. 2011. Available in: <<http://www.fishbase.org>>. Accessed in: 03 jun. 2012.

- [15] J.M. Galo, D.P. Streit, R.N. Sirol, R.P. Ribeiro, M. Digmayer, V.X.L. Andrade, A.R. Ebert, Spermatic abnormalities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) after cryopreservation, *Braz. J. Biol.* 71 (2011) 693-99.
- [16] E.T. Garside, Effects of oxygen in relation to temperature on the development of embryos of brook trout and rainbow trout, *J. Fish. Res. B. Can.* 23 (1966) 1121-1134.
- [17] M. Guan, D.M. Rawson, T. Zhang, Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes by vitrification, *Cryoletters* 31 (2010) 230-238.
- [18] M. Hagedorn, S.L. Lance, D.M.Fonseca, F.W. Kleinhans, D. Artimov, R. Fleisher, A.T.M.S. Hoque, M.B. Hamilton, B.S. Pukazhenti, Altering Fish embryos with aquaporin-3: an essential step toward successful cryopreservation. *Biol. Reprod.* 67 (2002) 961-66.
- [19] M. Hagedorn, A. Peterson, P. Mazur, F.W. Kleinhans, High ice nucleation of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option, *Cryobiology* 49 (2004) 181-189.
- [20] F. Lahnsteiner, The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Danio rerio*) embryos, *Theriogenology* 69 (2008) 384-396.
- [21] S.L. Lance, A.S. Peterson, M. Hagedorn, Developmental expression of aquaporin-3 in zebrafish embryos (*Danio rerio*), *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 138 (2004) 251-258.

- [22] J. Li, L.L. Zhang, Q.H. Liu, X.Z. Xu, Z.Z. Xiao, D.Y. Ma, S.H. Xu, Q.Z. Xue, Extra- and intra-cellular ice formation of red seabream (*Pagrus major*) embryos at different cooling rates, *Cryobiology* 59 (2009) 48-53.
- [23] X.-H. Liu, T. Zhang, M. Rawson, Effect of cooling rate and partial removal of yolk on the chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos, *Theriogenology* 55 (2000) 1719-1731.
- [24] T.S. Lopes, E. Romagosa, D.P. Streit Jr, R.P. Ribeiro, M. Digmayer, Cooling of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos at various stages of development for 6 or 10 hours, *Theriogenology* 75 (2011) 570-76.
- [25] A.V. Makarevich, E. Kubovicová, M. Popelková, D. Fabian, S. Cikos, J. Pivko, P. Chrenek, Several aspects of animal embryo cryopreservation - antifreeze protein (AFP) as a potential cryoprotectant, *Zygote* 18 (2009) 145-153.
- [26] S. Martínez-Páramo, S. Pérez-Cerezales, V. Robles, L. Anel, M.P. Herráez, Incorporation of antifreeze proteins into zebrafish embryos by a non-invasive method, *Cryobiology* 56 (2008) 216-222.
- [27] S. Martínez-Páramo, V. Barbosa, S. Pérez-Cerezales, V. Robles, M.P. Herráez, Cryoprotective effects of antifreeze proteins delivered into zebrafish embryos, *Cryobiology* 58 (2009) 128-133.
- [28] A.B. Miliorini, L.D.S. Murgas, P.V. Rosa, G. Oberlender, G.J.M. Pereira, D.V. Costa, A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation, *Aquac. Res.* 42 (2011) 177-187.

[29] A.B. Miliorini, M.S. Paulino, J.S.S. Bueno Filho, L.D.S. Murgas, P. Vieira e Rosa, Cooling and freezing of embryos of Dourado (*Salminus brasiliensis*) and Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), two endangered Brazilian teleost fish, *Theriogenology*, 2012 (submitted).

[30] K. Nakatani, A.A. Agostinho, G. Baumgartner, A. Bialecki, P.V. Sanches, M.C. Makrakis, C.S. Pavanelli. Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação [Eggs and larvae of freshwater fish: development and identification manual], Maringá, EDUEM, 2001.

[31] A. Ninhaus-Silveira, F. Foresti, A. Azevedo, C.A. Agostinho, R. Verissimo-Silveira, Cryogenic preservation of embryos of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae), *Zygote* 17 (2008) 45-55.

[32] D.A.J. Paula, M.R. Ferreira, L.D.S. Murgas, D. Rabelo, E.S. Andrade, G.C. Veras, Associação de diferentes soluções crioprotetoras para o desenvolvimento de protocolos de congelamento em embriões de curimba (*Prochilodus lineatus*), 2011, In: Conferência Latinoamericana Sobre Cultivo de Peixes Nativos, 3.; Congresso Brasileiro de Produção de Peixes Nativos, 3., 2011, Lavras. Anais... Lavras: UFLA, 2011.

[33] R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>, 2011

- [34] V. Robles, E. Cabrita, G.L. Fletcher, M.A. Shears, M.J. King, M.P. Herráez, Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species, *Theriogenology* 64 (2005) 1633-1646.
- [35] V. Robles, E. Cabrita, L. Anel, M.P. Herráez, Microinjection of the antifreeze protein type III (AFPIII) in turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos: Toxicity and protein distribution, *Aquaculture* 261 (2006) 1299-1306.
- [36] P. Routray, T. Suzuki, C.A. Strüssmann, R. Takai, Factors affecting the uptake of DMSO by the eggs and embryos of medaka, *Oryzias latipes*, *Theriogenology* 58 (2002) 1483-1496.
- [37] P.F. Taitson, E. Chami, H.P. Godinho, Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): A protocol to freeze its sperm in the field, *Anim. Reprod. Sci.* 105 (2008) 283-291.
- [38] D.R. Tataje, E. Zaniboni Filho, Cultivo do gênero *Leporinus*, pp. 81-104. In: Baldisserotto, B. & L. C. Gomes (Eds.). *Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil*. Santa Maria, UFSM, 2005. 470 p.
- [39] M. Tena-Sempere, A. Felip, A. Gómez, S. Zanuy, M. Carrillo, Comparative insights of the kisspeptin/kisspeptin receptor system: Lessons from non-mammalian vertebrates, *Gen. Comp. Endocr.* 175 (2012) 234-243.
- [40] S. Tsai, D.M. Rawson, T. Zhang, Development of cryopreservation protocols for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles using controlled slow cooling, *Theriogenology* 71 (2009) 1226-1233.

[41] L.F.M. Van Zutphen, V. Baumans, A.C. Beynen, Principles of Laboratory Animal Science, Revised Edition, Elsevier B.V., 2001.

[42] A.T.M., Viveiros, H.P. Godinho, Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review, Fish Physiol Biochem 35 (2009) 137-50.

[43] R.Y. Wang, M. Guan, D.M. Rawson, T. Zhang, Ultrasound enhanced methanol penetration of zebrafish (*D. rerio*) embryos measured by permittivity changes using impedance spectroscopy, Eur. Biophys. J. 37 (2008) 1039-1044.

[44] B. Wowk, E. Leidl, C.M. Rasch, N. Mesbah-Karimi, S.B. Harris, G.M. Fahy, Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents, Cryobiology 40 (2000) 228-236.

[45] T. Zhang, D.M. Rawson, Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryo, Cryobiology 33 (1996) 1-13.

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

[47] Y.Z. Zhang, S.C. Zhang, X.Z. Liu, Y.J. Xu, J.H. Hu, Y.Y. Xu, J. Li, S.L. Chen, Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos, Theriogenology 63 (2005) 763-773. an, S.; Lal, K. K.; Lakra, W. S. Cryopreservation of fish gametes and embryos. Indian Journal of Animal Science, v. 80, p. 109-124, 2010.

VERSÃO PRELIMINAR