



DANIELLA APARECIDA DE JESUS PAULA

**SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS PARA
EMBRIÕES DE CURIMBA (*Prochilodus lineatus*)
E ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

LAVRAS - MG

2013

DANIELLA APARECIDA DE JESUS PAULA

**SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS PARA EMBRIÕES DE CURIMBA
(*Prochilodus lineatus*) E ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr.Luis David Solis Murgas

LAVRAS - MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Paula, Daniella Aparecida de Jesus.

Soluções crioprotetoras para embriões de curimba - *Prochilodus lineatus* e zebrafish - *Danio rerio* / Daniella Aparecida de Jesus
Paula. – Lavras : UFLA, 2013.

149 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Luis David Solis Murgas.

Bibliografia.

1. Peixes - Embriões - Conservação. 2. Peixes - Crioprotetores.
3. Peixes - Reprodução. 4. Peixes - Morfologia. 5. Nanotubos de carbono. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.375

DANIELLA APARECIDA DE JESUS PAULA

**SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS PARA EMBRIÕES DE CURIMBA
(*Prochilodus lineatus*) E ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 4 de outubro de 2013.

Dra. Cristina Delarete Drummond	UFLA
Dra. Laura Helena Órfão	UNIFENAS
Dra. Sheila Cristina da Silva Victorio	UNICAMP
Dra. Mônica Rodrigues Ferreira Machado	PUC-GO

Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador

LAVRAS - MG

2013

Deus,

Sempre presente em minha vida

A meus pais,

Antônio Carlos de Paula e Regina Aparecida de Jesus Paula

A meus irmãos,

Marcela Aparecida de Paula e Raphael Antônio de Paula

Ao meu namorado,

Vinicius Pacífico de Oliveira Guedes

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela saúde, fé, esperança, força e pela certeza de sempre estar ao meu lado, me guiando e abençoando.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia juntamente com o Programa de Pós-graduação em Zootecnia, pela oportunidade.

Ao Prof. Luis David Solis Murgas, pela brilhante orientação, amizade, ensinamentos e oportunidade concedida. Não há palavras para descrever o quanto sou grata por me receber de braços abertos no grupo.

À Prof^a. Mônica Rodrigues Ferreira Machado, primeiramente pelos momentos de amizade e confiança a mim dedicados, pela brilhante coorientação, pelo apoio e pela compreensão em todos os momentos.

À Prof^a. Cristina Delarete Drummond, pela ajuda na elaboração deste trabalho, pelas sugestões, pelo apoio e pela participação na banca de defesa.

À Dr^a. Sheila Cristina da Silva Victorio, pela participação na banca de defesa, pelas sugestões e apoio.

À Prof^a. Laura Helena Órfão, pela participação na banca de defesa, pelas sugestões e apoio.

À Dr^a. Claudia Regina Gontijo Labory, primeiramente pela bela e importante amizade e pelo auxílio nas amostras para a microscopia eletrônica.

A meu namorado Vinícius, sempre a meu lado, pela dedicação e amor, principalmente por me ajudar e me compreender nas horas mais difíceis.

A meus pais, pela dedicação, carinho e incentivo nos momentos em que precisei. Não há palavras para expressar minha gratidão a vocês.

Aos amigos de pós-graduação, Estefânia de Sousa Andrade, Viviane de Oliveira Felizardo, Raquel Tatiane Pereira, Eliane Andrade Souza e Aline Ferreira Souza de Carvalho principalmente pelos momentos felizes e de muita amizade, pelo companheirismo e pela ajuda na execução dos experimentos.

Aos alunos de graduação e Bic-Júnior, Julia de Oliveira Alvarenga, Isadora de Lima Assis, Letícia Abreu, Carine Rodrigues Pereira, Laís Teodoro Libeck, pela amizade e pelo auxílio na execução e análise dos experimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro através do projeto MCT/CNPq N° 014/2011.

À Estação Ambiental de Itutinga, da Companhia Energética de Minas Gerais (EAI-CEMIG), nas pessoas Sr. Manoel e Sr. Darli, que forneceram apoio para a realização das coletas e aos funcionários Gilson e Jailson, pela colaboração e apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Capes, pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de doutorado sanduíche durante os três meses que permaneci na Argentina, pelo convênio com a Universidade Nacional de Rosário.

À Universidade Nacional de Rosário e ao Laboratório de Biologia molecular de Rosário, Santa Fé- Argentina, onde me receberam com muito carinho e dedicação. Em especial, à Prof^a. Silvia Arranz, que foi uma amiga e orientadora durante minha permanência no doutorado sanduíche e que proporcionou horas de muito aprendizado e afeto.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária, Wiliam e Joélson, pelo apoio e dedicação em vários momentos, durante o meu curso de doutorado.

Enfim, a todos que de algum modo, fizeram parte desta caminhada.

"Eu segurei muitas coisas em minhas mãos, e eu perdi tudo; mas tudo que eu coloquei nas mãos de Deus eu ainda possuo."

Martin Luther King

RESUMO

O resfriamento/congelamento de embriões de peixes permite diversas aplicações práticas e de conservação da biodiversidade, entretanto, novas substâncias devem ser testadas a fim de melhorar os resultados desse processo e obter o sucesso na criopreservação. Diante disso, foram desenvolvidos estudos com diferentes substâncias e os resultados divididos em artigos científicos. Objetivou-se, no primeiro artigo submeter embriões de *Prochilodus lineatus* às incubadoras experimentais com soluções de álcool polivinílico, hidroxietilcelulose (HEC), gelatina e soro fetal bovino combinadas ao dimetilsulfóxido (DMSO) ou etilenoglicol e determinar a combinação de crioprotetores menos tóxica e sua influência na morfometria dos embriões, além de comparar a eficiência de incubadoras experimentais com as incubadoras tipo funil, pela temperatura, oxigênio e taxa de fertilização das mesmas. A maior porcentagem de embriões viáveis observada foi em 3% de DMSO e 1% de HEC, e os embriões foram influenciados quanto a sua morfometria pelos crioprotetores. Observou-se que as incubadoras experimentais podem ser utilizadas como modelos experimentais pois, a taxa de fertilização não foi influenciada. Objetivou-se, no segundo artigo, submeter embriões de *Danio rerio* às soluções contendo HEC ou sacarose (SAC) combinadas ao DMSO e determinar a combinação de crioprotetores menos tóxica e sua influência no resfriamento (0°C) e na morfometria dos embriões. A porcentagem média de eclosão, de larvas anormais e as análises morfométricas foram influenciadas pelos tempos de exposição no resfriamento e no teste de toxicidade. Foram observados edema do pericárdio e do saco vitelínico e má formação axial em todos os tratamentos. A HEC e a SAC combinadas ao DMSO podem ser utilizadas durante 2h de resfriamento a 0°C, mantendo a porcentagem de eclosão média de 60%. Objetivou-se, no terceiro artigo, submeter embriões de *P. lineatus* às soluções com DMSO, SAC e nanotubos de carbono (NTCs) e avaliar sua influência na viabilidade das larvas, na morfometria dos embriões e na criopreservação dos mesmos. NTCs associados ao DMSO e a SAC não foram tóxicos aos embriões de curimba, porém influenciaram as análises morfométricas e não foram suficientes em protegê-los durante o congelamento e descongelamento, pois, às 3h pós-descongelamento nenhum embrião sobreviveu. NTCs adentraram os embriões e mantiveram alta porcentagem de embriões íntegros.

Palavras-chave: Conservação. Crioprotetores. Nanotubos de carbono. Peixes. Reprodução.

ABSTRACT

The cooling/freezing of fish embryos allows many practical and biodiversity conservation applications, however, new substances must be tested in order to improve the results of this process and obtain success in cryopreservation. Therefore, we developed studies with different substances, and the results were divided into three scientific articles. The objectives of the first article were to submit *Prochilodus lineatus* embryos to experimental incubators with polyvinyl alcohol, hydroxyethyl cellulose (HEC), bovine fetal serum and gelatin solutions combined with dimethyl sulfoxide (DMSO) or ethylene glycol and determine the least toxic combination of cryoprotectants and its influence on embryo morphometry, as well as compare the efficiency of experimental incubators with funnel type incubators by temperature, oxygen and fertilization rate of the same. The highest percentage of viable embryos observed was 3% DMSO and 1% HEC, and the embryos were influenced in their morphometry by the cryoprotectants. We verified that the experimental incubators may be used as experimental models because the fertilization rate was not affected. The objectives of the second article were to submit *Danio rerio* embryos to solutions containing HEC and sucrose (SUC) combined with DMSO, and determine the least toxic combination of cryoprotectants and its influence on cooling (0°C) and embryo morphometry. The average hatching rate of abnormal larvae and the morphometric analysis are influenced by the exposure times in cooling and in the toxicity test. We observed pericardial edema, edema of the yolk sac and axial malformation in all treatments. The HEC and SUC combined with the DMSO may be utilized for 2h of cooling at 0°C, maintaining the average hatching percentage of 60%. The objectives of the third article were to submit *Prochilodus lineatus* embryos to solutions containing DMSO, SUC and carbon nanotubes (CNTs), and evaluated its influence on larvae viability, embryo morphometry and cryopreservation. CNTs associated with DMSO and SUC were not toxic to curimba embryos, however, they influenced the morphometric analyses and were not sufficient to protect the embryos during freezing and thawing because, 3h after thawing, none of the embryos survived. The CNTs penetrated the embryos and maintained a high percentage of intact embryos.

Keywords: Conservation. Cryoprotectants. Carbon nanotubes. Fish. Reproduction.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Imagem representativa dos nanotubos de carbono (a) de parede simples, (b) de paredes múltiplas, (c) agregados de nanotubos de carbono	33
----------	---	----

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Fig. 1.	Representative image of the experimental incubators	86
---------	---	----

ARTIGO 2

Figura 1	- Análise morfométrica de embriões de zebrafish durante o resfriamento com Hidroxietilcelulose, Sacarose e Dimetilsulfóxido a 0°C pelo IMAGE J	96
Figura 2	- Porcentagem média de eclosão de larvas de <i>D. rerio</i> submetidas ao teste de toxicidade a 28°C com hidroxietilcelulose (HEC), Sacarose (SAC) e Meio E3 e associados ao dimetilsulfóxido (DMSO).....	98
Figura 3	- Porcentagem média de eclosão de larvas de <i>D. rerio</i> submetidas ao resfriamento (0°C), sem crioprotetores e com Hidroxietilcelulose e Sacarose associada ao dimetilsulfóxido (DMSO).....	99
Figura 4	- Porcentagem média de larvas com má formações de <i>D. rerio</i> submetidas ao resfriamento (0°C), sem crioprotetores (Controle negativo) e com Hidroxietilcelulose e Sacarose associadas ao dimetilsulfóxido (DMSO).....	100
Figura 5	- Imagens de microscopia de larvas de zebrafish, durante o resfriamento a 0°C com HEC, SAC e DMSO	101

ARTIGO 3

Figura 1 -	Imagens das incubadoras de manutenção (IEM)	121
Figura 2 -	Incubadoras experimentais de tratamento (IET).....	123
Figura 3 -	Análise morfométrica dos embriões de curimba durante a incubação com Sacarose, DMSO e Nanotubos de Carbono a 27°C	124
Figura 4 -	Análise em microscópio de luz de embriões de <i>P. lineatus</i> , corados com HE, submetidos ao T0 e com 60 minutos de exposição.....	131
Figura 5 -	Análise em microscópio de luz de embriões de <i>P. lineatus</i> , corados com HE, submetidos ao T5 e com 60 minutos de exposição.....	132
Figura 6 -	Análise em microscópio de luz de embriões de <i>P. lineatus</i> , corados com HE, submetidos ao T6 e com 60 minutos de exposição.....	133
Figura 7 -	Análise em microscópio de luz de embriões de <i>P. lineatus</i> , corados com HE, submetidos ao T5 e com 105 minutos de exposição.....	134
Figura 8 -	Análise em microscópio eletrônico de transmissão de embriões de <i>P. lineatus</i> submetidos ao T3 por 105 minutos de exposição ao nanotubos de carbono	135
Figura 9 -	Análise em microscópio eletrônico de transmissão de embriões de <i>P. lineatus</i> submetidos ao T4 por 105 minutos de exposição ao nanotubos de carbono	136
Figura 10 -	Análise em microscópio eletrônico de transmissão dos NTCs utilizados no experimento (A)	137
Figura 11 -	Embriões de <i>P. lineatus</i> submetidos ao T5 e descongelados à TD2	139

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

- Table 1. Average temperature ($^{\circ}\text{C}$), average oxygen (mg/L), average fertilization rate (%) and standard deviation in the experimental and funnel type incubators used in the experiment with curimba embryos ($n=6$). ^a Averages followed by different letters in the line differ by the Sckott Knott test ($p<0.05$). 82
- Table 2. Average percentage (%) and standard deviation of viable larvae of curimba subjected to different cryoprotectants. ^{a,b} Averages followed by different capital letters in the line and small letters in the columns differ by the Krustal-Walis test ($p<0.05$). 83
- Table 3. Average diameter chorio (CD) (μm) and standard deviation of embryos curimba subjected to different cryoprotectants and different time (during 60 min). DMSO: dimethylsulfoxide; ET: ethylene glycol; PVA: polyvinyl alcohol; GEL: gelatin; HIDR: hydroxyethylcellulose; BSF: fetal bovine serum; 8: 8%; 4: 4%. ^{a*}Differ from control by the Test Dunnett ($P < 0.05$)..... 84
- Table 4. Average diameter embryo (ED) (μm) and standard deviation of embryos curimba subjected to different cryoprotectants and different time (during 60 min). DMSO: dimethylsulfoxide; ET: ethylene glycol; PVA: polyvinyl alcohol; GEL: gelatin; HIDR: hydroxyethylcellulose; BSF: fetal bovine serum. ^{a*}Differ from control by the Test Dunnett ($P < 0.05$)..... 85

ARTIGO 2

Tabela 1 - Área total (AT), diâmetro médio do cório (CD) e diâmetro médio do embrião (ED) em μm dos embriões de <i>D. rerio</i> submetidos ao r (0°C), sem crioprotetores e com Hidroxietilcelulose e Sacarose associadas ao Dimetilsulfóxido (DMSO).....	102
--	-----

ARTIGO 3

Tabela 1 - Porcentagem média de eclosão das larvas vivas, larvas vivas e malformadas, e larvas mortas de embriões de <i>P. lineatus</i> submetidos ao teste de toxicidade, com diferentes crioprotetores	128
Tabela 2 - Área total (AT) em μ^2 , diâmetro médio do cório (CD) e diâmetro médio do embrião (ED) em μm dos embriões de <i>P. lineatus</i> submetidos ao teste de toxicidade com diferentes crioprotetores	129
Tabela 3 - Porcentagem média de embriões íntegros de <i>P. lineatus</i> submetidos a diferentes tratamentos e diferentes temperaturas de descongelamento	138

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	Espécies em estudo	18
2.1.1	<i>Prochilodus lineatus</i> (Valenciennes, 1837).....	18
2.1.2	<i>Danio rerio</i> (Hamilton, 1822).....	19
2.2	Importância em conservar embriões	20
2.3	Características dos embriões de peixes quanto à criopreservação	22
2.4	Resfriamento e Congelamento	23
2.5	Crioprotetores	26
2.6	Outras substâncias	29
2.7	Nanopartículas	31
2.7.1	Nanotubos de carbono	32
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	35
	REFERÊNCIAS	36
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	47
	ARTIGO 1 Toxicity of cryoprotectants for curimba (<i>Prochilodus lineatus</i>) embryos in experimental incubator (Characiformes: Prochilodontidae)	47
	ARTIGO 2 Embriões de zebrafish (<i>Danio rerio</i>) resfriados com hidroxietilcelulose e sacarose associadas ao dimetilsulfóxido	87
	ARTIGO 3 Embriões de <i>Prochilodus lineatus</i> criopreservados com nanotubos de carbono, associados ao dimetilsulfóxido e a sacarose	114

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que no Brasil existam 2.835 espécies de peixes de água doce e 1.201 espécies marinhas (FROESE; PAULY, 2013), dados expressivos e relacionados diretamente com a localização geográfica na região tropical, com as dimensões territoriais e com a quantidade e tamanho de bacias hidrográficas. Segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO (2010), a aquicultura tem avançado bastante em diversos países da América Latina, e o Brasil encontra-se nesse ranking como um dos produtores líderes no desenvolvimento, produzindo quantidades crescentes de diversas espécies de peixes.

A curimba (*Prochilodus lineatus*), espécie nativa da América do Sul (VIVEIROS; GODINHO, 2009), representa um papel importante no seu ecossistema, bem como na subsistência e na pesca comercial no Sul do Brasil. Por ser uma espécie de piracema, tem seu ciclo reprodutivo afetado pela poluição, pesca predatória, construção de barragens e modificações nos cursos dos rios (VIVEIROS, 2009). Estudos com a reprodução dessa espécie são sugeridos para prevenir a diminuição dos estoques e assegurar a sua permanência (CUADRADO et al., 2013).

As grandes barragens constituem obstáculo à rota migratória dos peixes de piracema, reduzindo a eficiência reprodutiva dessas espécies (BEDORE, 1999). Além disso, a sobrepesca, a captura em períodos de desova e a diminuição da qualidade da água, devido à elevadas cargas de biocidas e esgotos domésticos, contribuem para o declínio dos estoques naturais de peixes. A preservação de embriões de peixes apresenta-se como uma alternativa viável tanto para a conservação de espécies ameaçadas como para a indústria piscícola.

O zebrafish (*Danio rerio*) é considerado um modelo para experimentação com peixes e utilizado pelos pesquisadores devido às suas inúmeras vantagens que incluem a alta fecundidade, o pequeno tamanho, o curto intervalo de geração e a transparência durante a embriogênese, influenciando diretamente na escolha desse animal (LAWRENCE, 2007). Além disso, experimentos utilizando essa espécie podem ajudar a obter respostas no processo de congelamento devido à disponibilidade de embriões durante todo o ano, quando mantidos em laboratório sob condições ambientais controladas e alimentação adequada.

A criopreservação permite a obtenção de bancos de germoplasma, que levam à redução da endogamia, a diminuição da pressão sobre as populações selvagens, e poderia também sustentar o fornecimento constante de animais obtidos somente em determinadas épocas do ano, o que diminuiria custos e reduziria o impacto da aquicultura, conservando a produtividade (HAGEDORN; KLEINHANS, 2011). Essa é uma técnica na qual as células ou tecidos são submetidas a períodos longos de manutenção em nitrogênio líquido, permitindo a conservação do material genético completo.

Características como o grande tamanho do embrião e conseqüentemente células grandes, diferente permeabilidade nos compartimentos embrionários e a semipermeabilidade de membranas que circundam o embrião são apontadas como as dificuldades no processo de criopreservação de embriões de peixes, que poderiam influenciar o influxo e efluxo de água e crioprotetores (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008; RALL, 1993). Sendo assim, existem poucos trabalhos relatando resultados positivos dessa biotecnologia para embriões de peixes.

A produção de peixes em grande escala pode determinar a diminuição da variabilidade genética nos estoques das pisciculturas, principalmente devido ao manejo reprodutivo inadequado, deficiência no número de reprodutores e seleção não intencional. Assim, são necessários estudos que viabilizem a técnica

de criopreservação/congelamento de embriões de peixes, sendo essa uma biotecnologia aplicada tanto em programas de conservação ecológico como em programas de produção zootécnica.

Os crioprotetores são substâncias químicas que protegem as células, durante o congelamento e descongelamento, sendo necessários a estes processos. Entretanto, os protocolos de congelamento de embriões baseiam-se em crioprotetores comumente utilizados para o congelamento de sêmen e a utilização de novas soluções, como os polímeros e os nanotubos, poderiam auxiliar nesse processo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Espécies em estudo

As espécies utilizadas nesse estudo são de grande importância, tanto economicamente, como no caso de *Prochilodus lineatus*, quanto cientificamente, para *P. lineatus* e *Danio rerio*. A seguir são descritos detalhes sobre cada uma delas.

2.1.1 *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837)

O gênero *Prochilodus* possui ampla distribuição na região Neotropical e 13 espécies descritas (REIS; KULLANDERS; FERRARIS-JUNIOR, 2003). A espécie *Prochilodus lineatus* é conhecida em todo o Brasil por diversos nomes: corimba, corimbata, corimbatá, corumbatá, curimatã, curimbatá, curumbatá, grumatá, grumatã e grumatão. Entre as diversas espécies nativas cultivadas, a curimba tem-se destacado por seu potencial para a piscicultura em policultivos (GALDIOLI et al., 2000).

A curimba é encontrada no leito dos rios durante a época seca, nos trechos de águas mais calmas e seu hábito alimentar é iliófago nas fases jovem e adulta, alimentando-se de organismos bentônicos e microrganismos em decomposição (LOGATO, 2000). Como é um animal migrador, não se reproduz em ambientes lênticos, a menos que induzido hormonalmente. O período reprodutivo dessa espécie inicia-se na primavera e com pico no verão. É uma espécie que responde sem dificuldades à indução hormonal (FREITAS et al., 2002), com uma fantástica prolificidade.

A curimba é muito utilizada em sistemas de policultivos no sul do País (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2002; FREITAS et al., 2002). As larvas dessa espécie são utilizadas para alimentação de espécies carnívoras durante a fase larval e é considerada espécie modelo para as demais espécies nativas devido à sua rusticidade e prolificidade. Além disso, os pesquisadores vêm se interessando pela utilização da curimba em diversas áreas (LIEBEL et al., 2011; PAULINO; SOUZA; FERNANDES, 2012; PEREIRA et al., 2013), incluindo alguns experimentos de criopreservação de sêmen e embriões (CUADRADO et al., 2013; FELIZARDO et al., 2010; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008).

2.1.2 *Danio rerio* (Hamilton, 1822)

O zebrafish (*Danio rerio*) ou “Paulistinha”, popularmente chamado no Brasil, é nativo do sul da Ásia, com origem nas partes baixas dos principais rios da Índia, Bangladesh e Nepal, região caracterizada pelo clima de monções, com estações secas e chuvosas bem definidas. Essa sazonalidade chuvosa exerce grandes efeitos nas condições ambientais e no habitat do zebrafish, tanto em termos de qualidade física e química da água, quanto na abundância de alimentos (DAMMSKI et al., 2011).

Considerada espécie modelo experimental o zebrafish é um dos peixes mais utilizados desde células tronco até as bases das mudanças comportamentais induzidas por vício em drogas, e sua utilização em pesquisas cresceu muito nas últimas décadas (DAMMSKI et al., 2011). Além de todas as áreas de pesquisa, podemos incluir também, experimentos que empregam os embriões desse teleósteo para testes com congelamento (ROBLES; CABRITA; HERRÁEZ, 2009).

As características que facilitam a criação do zebrafish em biotérios incluem: tamanho pequeno, alta fecundidade, facilidade de cultivo, embriões grandes e transparentes e de desenvolvimento rápido. A utilização dessa espécie como modelo para protocolos de resfriamento e congelamento pode ajudar a reunir informações necessárias para desenvolvimento de protocolos que sejam aplicáveis às espécies nativas.

Devido à disponibilidade de embriões durante todo o ano, quando mantidos em laboratório, têm-se grande quantidade de material disponível na literatura e por isso, essa espécie é amplamente utilizada.

2.2 Importância em conservar embriões

O congelamento de gametas e embriões representa uma ferramenta importante utilizada em programas de melhoramento e conservação de recursos genéticos, permitindo a formação de bancos de estocagem de embriões, com interface em programas de conservação *in* e *ex situ*, manutenção da integridade e heterozigose. Representando assim, um potencial para proteção e manejo de espécies ameaçadas (ANDRABI; MAXWELL, 2007; PEREIRA; MARQUES, 2008; WOELDERS; ZUIDBERG; HIEMSTRA, 2006).

De acordo com Denniston et al. (2011), os estudos com a criopreservação de embriões têm sido desenvolvidos desde meados dos anos 70 e proporcionaram uma metodologia básica para o congelamento da maioria dos embriões de mamíferos.

Segundo este mesmo autor, o protocolo modelo para ratos foi confirmado no final de 1970, permitindo que o foco dos estudos fosse o aperfeiçoamento das metodologias no congelamento de embriões bovinos e desde então, vários protocolos de congelamento têm sido desenvolvidos para embriões de animais domésticos e de laboratório e toda essa pesquisa resultou

em descendência viável de, pelo menos, 14 espécies de mamíferos (RALL, 1993).

A criopreservação de embriões é menos avançada nos outros vertebrados (peixes, aves, répteis e anfíbios) em que os desafios são mais complexos quando comparados, por exemplo, aos mamíferos. A causa apontada é: baixa área de superfície em relação ao volume, portanto, menor movimento de água e crioprotetores através da membrana celular durante a refrigeração, congelamento e descongelamento (SARAGUSTY; ARAV, 2011).

A criopreservação de sêmen de peixes é uma ferramenta bastante utilizada se comparada à criopreservação de embriões para essas espécies. Há, pelo menos, 17 espécies brasileiras na lista de peixes de água doce que foram objetos de estudo na qualidade do sêmen e/ou criopreservação nos últimos anos (VIVEIROS; GODINHO, 2009). Entretanto, para programas de conservação, a criopreservação de sêmen representa o armazenamento exclusivamente do material genético paterno e, por isso, conservar embriões, por longos períodos, seria uma importante alternativa na preservação do material diploide (DIWAN et al., 2010; TSAI; LIN, 2012).

Outro fator que influencia a criopreservação de embriões de peixes é a biologia de algumas espécies economicamente importantes. Também conhecidas por espécies de piracema, quando adultas apresentam padrões de deslocamento reprodutivo, que consistem na migração do sítio de alimentação para o de desova em centenas de quilômetros (GODINHO, 2007). Assim, a dependência da sazonalidade dessas espécies é um fator importante a ser considerado quando se trata da criopreservação de embriões, visto que o armazenamento dos mesmos seria uma alternativa viável no manejo comercial e reprodutivo dessas espécies.

Algumas pesquisas apontam o caminho para o desenvolvimento de protocolos da criopreservação de embriões de peixes (CHEN; TIAN, 2005; ROBLES et al., 2005). Entretanto, mais estudos são necessários para identificar

as alternativas mais promissoras e incorporar essa biotecnologia na rotina dos diversos laboratórios e pisciculturas com objetivos de formação de bancos de germoplasma, no melhoramento genético e principalmente na produção zootécnica.

2.3 Características dos embriões de peixes quanto à criopreservação

Um dos maiores problemas relatados está relacionado com o tamanho do embrião de peixes, que é maior que a maioria dos embriões de mamíferos e exibem parâmetros criobiológicos diferentes. Além disso, a semipermeabilidade do córion diminui a capacidade de penetração do crioprotetor. Esses fatos determinam uma barreira importante para que o crioprotetor permita uma remoção osmótica da água durante o processo de resfriamento, explicando a baixa efetividade da utilização das técnicas tradicionais (HAGEDORN et al., 2004).

Quando o resfriamento é suficientemente lento, as células são capazes de perder água rapidamente por osmose, suportando a desidratação, mantendo o equilíbrio do potencial químico da água e da solução intracelular com a água extracelular (MERYMAN; WILLIAMS; DOUGLAS, 1977). Porém, esse mesmo autor mostra que a exposição das células à solução crioprotetora leva a um estresse osmótico, que dependendo da concentração, duração e temperatura de exposição à solução, a célula pode entrar em colapso.

Por outro lado, se o resfriamento for rápido, o potencial químico da água e da solução extracelular diminui mais rápido do que o da água intracelular, resultando em água intracelular remanescente que, eventualmente, forma gelo na célula que, muitas vezes, é letal para as células (ZHANG, 2007). Protocolos de congelamento lento promovem a remoção da água intracelular durante o

resfriamento, sendo estimado que 90% da mesma devam ser retiradas para se evitar a formação de gelo (HAGEDORN et al., 2004).

A sensibilidade ao frio também é marcada como um dos fatores a dificultar o congelamento de embriões e a temperatura mais sensível deve ser determinada, para cada espécie em particular. Embora não se tenha certeza dos mecanismos responsáveis pelos danos causados pelo frio, algumas características são apontadas, por exemplo: estágio de desenvolvimento embrionário mais sensível ao congelamento (AHAMMAD; BHATTACHARYYA; JANA, 2003; LOPES et al., 2011) e a formação de gelo intracelular ocasionando danos nas membranas dos embriões (FORNARI et al., 2011; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2008).

De acordo com Lahnsteiner (2008), estágios ontogenéticos iniciais são mais sensíveis pela incapacidade de compensar o efeito tóxico do crioprotetores. Para embriões de *Piaractus mesopotamicus*, a fase de fechamento de blastóporo foi adequada para sobrevivência de 69,2% dos embriões resfriados a -8°C com 17,1% sacarose e 9% metanol (STREIT et al., 2007).

2.4 Resfriamento e Congelamento

Dentre os métodos de conservação de embriões podemos destacar o resfriamento que consiste na preservação dos gametas e embriões viáveis sob temperaturas baixas, porém, acima do ponto de congelamento. O resfriamento objetiva diminuir o metabolismo e prolongar a viabilidade dos embriões, resultando em uma alternativa viável a curto prazo (PEREIRA, 2010; AHAMMAD; BHATTACHARYYA; JANA, 2003).

O congelamento é uma técnica na qual as células são submetidas a períodos longos de manutenção em temperaturas abaixo do ponto de congelamento, com auxílio ou não de nitrogênio líquido (CARNEIRO, 2007).

Alguns estudos utilizando protocolos de resfriamento e congelamento de embriões de peixes foram descritos por Ahammad, Bhattacharyya e Jana (1998) para *Labeo rohita*, *Catla catla* e *Cirrhinus mrigalha*, por Dinnyés et al. (1998) para *Ciprinus carpio*, por Ahammad, Bhattacharyya e Jana (2002) para *Cyprinus carpio* e por Lahnsteiner (2008) para *Danio rerio*. Estudos com peixes migradores foram realizados por Fornari et al. (2011) e Streit et al. (2007), os quais utilizaram protocolos semelhantes em *Piaractus mesopotamicus*.

Para a criopreservação/vitrificação se faz necessário o uso do nitrogênio líquido (temperatura próxima a -196°C), entretanto, a vitrificação se diferencia da criopreservação pelo fato das células serem acondicionadas diretamente em nitrogênio líquido, passando pelo estado vítreo sem nenhuma curva de resfriamento/congelamento, podendo evitar segundo alguns autores, a formação de gelo intracelular.

Estudos realizados com embriões de zebrafish (*Danio rerio*) apresentaram efeito das curvas de resfriamento lento ($10^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$), intermediário ($30^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$) e rápido ($\sim 300^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$), utilizando-se como crioprotetor o metanol, em diferentes estágios embrionários (ZHANG; LIU; RAWSON, 2003). Os autores verificaram que o efeito do metanol foi mais pronunciado quando os embriões foram submetidos ao resfriamento lento, não apresentando diferenças significativas em relação ao controle. Nas demais curvas, a taxa de eclosão após o resfriamento foi significativamente menor.

Nos últimos anos, vários métodos para o congelamento de embriões de bovinos que se baseiam em uma curva de diminuição da temperatura padrão foram desenvolvidos por Willadsen, Polge e Rowson (1976). Esses trabalhos correlacionam a queda de temperatura em função do tempo obtido com a

velocidade de 3°C a 1°C/minuto e, a indução à cristalização da solução crioprotetora (*seeding*) na temperatura de -7°C com gradativa queda até -33 a -35°C e, posteriormente, armazenado em nitrogênio líquido (N₂).

Avaliando a influência dos estágios embrionários do *Labeo rohita* no processo de criopreservação, Ahammad, Bhattacharyya e Jana (2003), perceberam que as melhores condições de estocagem dos embriões, em temperatura abaixo de zero, é no estágio embrionário intermediário, aproximadamente 12 horas pós-fertilização. Os blastômeros de *Oncorhynchus keta*, submetidos ao *seeding* entre -5 e -100°C apresentaram altos níveis de sobrevivência em relação aos que não foram submetidos a esse procedimento. Esse método é importante para o congelamento de embriões de várias espécies, evitando-se danos fatais atribuídos à destruição da membrana e desidratação dos embriões, que leva a um aumento da temperatura interna, por liberação do calor latente (KUSUDA; TERANISHI; KOIDE, 2002).

Outros métodos como o de vitrificação são citados por Steponkus et al. (1990) e Wusteman, Robinson e Pegg (2004), que acreditam que essa seja a alternativa para se alcançar sucesso com a criopreservação de embriões muito sensíveis à redução da temperatura (como os de peixe, por exemplo). Resultados prévios têm demonstrado que embriões de turbot (*Scophthalmus maximus*) possuem elevada resistência à vitrificação em relação ao zebrafish evidenciado pelos menores danos celulares ocorridos (ROBLES et al., 2004). Contudo, nenhum dos embriões das outras espécies, estudadas por esses autores, sobreviveu ao processo. Diante disso, faz-se necessário o desenvolvimento de novas técnicas que visem uma melhor eficiência no processo de congelamento de embriões e que permita uma viabilidade do embrião após o congelamento.

Os resultados com o resfriamento são bastante satisfatórios, porém essas técnicas não são adequadas para estocagem do material genético por um longo período de tempo. Assim, são necessários estudos que possibilitem a criação de

técnicas de congelamento de embriões de peixes, para acondicionamento desses em nitrogênio líquido e manutenção em longo prazo destas células de maneira viável. No entanto, enquanto os resultados não são satisfatórios com a criopreservação de embriões, o resfriamento fornece uma alternativa para manutenção dos embriões por um período menor e fornecem ainda respostas com relação a ação dos crioprotetores sobre o metabolismo dos embriões, quando submetidos a essas técnicas.

2.5 Crioprotetores

Os embriões submetidos à criopreservação estão sujeitos ao estresse resultante da interação água e solução, responsáveis pela formação de cristais de gelo, causando dano estrutural ou até mesmo a morte das células (HOLT, 2000). A utilização de solução para a criopreservação inclui soluções crioprotetoras adequadas que penetram e desidratam as células, minimizando alterações celulares e danos na membrana celular ocasionados pela formação de cristais de gelo, que é citado como principal razão para falha no processo de criopreservação (LI et al., 2009). Além disso, a baixa toxicidade e a alta solubilidade na água são requisitos essenciais para um agente químico ser considerado crioprotetor (CHAO; LIAO, 2001).

As substâncias que exercem funções crioprotetoras são divididas em crioprotetores intra e extracelulares. O crioprotetor intracelular é uma substância química capaz de retirar a água da célula e diminuir a temperatura de congelamento no seu interior, impedindo a formação de cristais de gelo internamente (CAROLSFELD et al., 2003). Entre os crioprotetores intracelulares podem-se destacar o dimetilsulfóxido, o metanol, o glicerol, o metilglicol, o etilenoglicol e o propilenoglicol.

O dimetilsulfóxido (DMSO) é um líquido orgânico, incolor, oleoso e sem odor, cuja fórmula é C_6H_6SO . É um composto derivado da lignina, substância responsável pela rigidez das células vegetais, e teve sua primeira utilização na preservação de órgãos (JACOB; HERSCHLER, 1983). O DMSO tem sido amplamente utilizado na criopreservação de sêmen e embriões de peixes (FELIZARDO et al., 2010; LAHNSTEINER, 2008; MURGAS et al., 2007; PEREIRA, 2010; VARELA-JÚNIOR, 2012).

O etilenoglicol é um líquido incolor, denso, inodoro, pouco volátil em temperatura ambiente e de baixo peso molecular, cuja fórmula é $C_2H_6O_2$. É produzido industrialmente a partir do etileno. O etilenoglicol é altamente hidrossolúvel e com capacidade de penetrar nas células e proteger seu citoplasma e organelas. Substâncias como o etilenoglicol também são capazes de diminuir a temperatura intracelular e impedir a formação de gelo intracelular (WOODS, 1999).

O etilenoglicol tem sido amplamente utilizado na criopreservação de sêmen e embriões de peixes (MENEZES, 2008; PAES, 2013; SALMITO-VANDERLEY, 2012).

Os crioprotetores extracelulares, ao contrário dos intracelulares, revestem a célula externamente, estabilizando a membrana e diminuindo os danos provocados pelo congelamento (CAROLSFELD et al., 2003). Em geral, a sacarose é o crioprotetor extracelular mais utilizado em experimentos com embriões de peixes (AHAMMAD; BHATTACHARYYA; JANA, 2002, 2003; PEREIRA, 2010; STREIT et al., 2007).

De acordo com Woelders (1997), as propriedades mecânicas dos meios que contém açúcares, por exemplo, a sacarose é de contribuir para redução da tensão mecânica provocada pela rápida deformação estrutural das células sob altas taxas de resfriamento. Protocolo para embriões de *P. mesopotamicus* foram

desenvolvidos por Streit et al. (2007) a -8°C pó, no mínimo, seis horas, contendo metanol (9%) e sacarose (17,1%) como soluções crioprotetoras.

Entre os crioprotetores extracelulares podem ser citados os polímeros (PVA - álcool polivinílico). O PVA apresenta características que determinam um importante papel na criopreservação de células. Além de inibir a formação de gelo nas soluções crioprotetoras, o PVA protege externamente as células, agindo como crioprotetor externo (VAJTA et al., 1999).

De acordo com Wowk (2000), copolímeros de PVA (associação de várias moléculas de PVA), em diferentes concentrações reduziram a utilização de glicerol e DMSO, necessárias para vitrificação de 10 ml de soluções em diferentes osmolaridades, sendo que 20% foram particularmente efetivos. Neste mesmo estudo, a formação de gelo em vidro borossilicado, foi inibida por 1 ppm de PVA. Essa solução parece bloquear a formação primária de cristais de gelo de uma maneira similar às AFP's (proteínas anticongelamento), encontradas em peixes. Outra vantagem seria com relação ao custo, visto que o PVA é menos oneroso, sendo uma excelente opção para melhorar os processos de criopreservação e vitrificação.

Utilizando-se embriões de rato, no estágio de mórula, foram comparados meios suplementados com BSA (Soro albumina bovina) e PVA, e após 15 dias de transferência foi observado que não houve diferença estatística nos índices de implantação embrionária e fetos vivos (NOWSHARI; BREM, 2000). Isso demonstra que o PVA pode substituir o BSA, em meios de congelamento para embriões de rato, sem apresentar toxicidade.

Em embriões de ovino, foi testada a viabilidade da substituição do BSA pelo PVA, na vitrificação e no descongelamento. Não houve diferença estatística nos índices de viabilidade avaliados nas diferentes soluções, sugerindo também uma ação positiva do PVA, durante esses processos. Porém, o mesmo efeito não

foi visualizado em embriões de bovino, sendo os índices de eclosão embrionárias inferiores para o PVA (VAJTA et al., 1999).

Em estudo realizado por Holt (2003), comparando a AFP III (antifreeze protein, proteína anticongelamento) do peixe *Ocean pouts* (*Macrozoarces americanus*), com a glicoproteína AFGP (antifreeze glycoprotein, glicoproteína anticongelamento) do *Dissostichus mawsoni* e uma solução de 80% de PVA (9 e 10 kDa) foram visualizados dois tipos de formação nuclear de gelo. Observou-se que a solução de PVA reduziu a temperatura de início de formação de gelo, assim como as proteínas anticongelantes. Porém, para que o mesmo efeito fosse determinado foram necessárias altas concentrações das proteínas anticongelantes, o que não ocorreu para o PVA.

2.6 Outras substâncias

A celulose é um composto orgânico muito abundante no planeta por ser componente estrutural das plantas, conferindo-lhes rigidez e forma. A hidroxietilcelulose (HEC) é um derivado da celulose que em diferentes concentrações, formam géis com diferentes viscosidades que poderiam beneficiar os embriões no processo de congelamento.

Este gel possibilita inúmeras aplicações bioquímicas, farmacêuticas e na bioengenharia como, por exemplo, liberação controlada de fármacos (KAJJARI; MANJESHWAR; AMINABHAVI, 2011), material para a construção de biossensores (ALBAREDA-SIRVENT; ARBEN; SALVADOR, 2000) e aplicações na engenharia de tecidos (ZULKIFL, 2013).

Substâncias como a HEC, não foram testadas em embriões de qualquer espécie, mas apresentam características de criogel, com formação de estruturas complexas e compartimentos porosos, que originam-se da gelanitização de solução aquosas concentradas (SHAPIRO; SHAPIRO, 1999). Devido a essas

propriedades somadas às características de não toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade da hidroxietilcelulose (PENG; CHEN, 2010), acredita-se ainda que essa substância possa agir como crioprotetor extracelular.

O SFB (Soro fetal bovino) é uma fonte protéica muito utilizada nos meios de cultura por aumentar a produção *in vitro* de embriões bovinos (ALI; SIRARD, 2002). É composto por uma variedade de substâncias, que incluem ácidos graxos, fatores de crescimento, substratos energéticos, aminoácidos e vitaminas, com concentrações variáveis dependendo do lote, remessas e fornecedores (TETZNER, 2007).

O SFB não é utilizado apenas para suplementação de embriões bovinos. Sugimoto (2012) também concluiu que a adição de 0,05% de SFB no meio de cultura para crescimento *in vitro* aumentou a capacidade de desenvolvimento de ovócitos de coelho cultivados *in vitro* ocasionados pelas melhores taxas de sobrevivência e de fertilização, após injeção intracitoplasmática de espermatozoides.

Tetzner (2007) concluiu que é possível produzir embriões bovinos na ausência de SFB e/ou BSA, com uma fonte protéica alternativa, a ovalbumina, porém a qualidade e a quantidade dos blastocistos bovinos foram inferiores àqueles produzidos com SFB e BSA. Devido a essas propriedades acredita-se que essa substância possa agir como crioprotetor extracelular, principalmente nutrindo e protegendo os embriões de peixes, durante o congelamento e principalmente durante o seu desenvolvimento.

A gelatina é um polímero natural e biodegradável obtido pelo tratamento ácido e alcalino do colágeno e pela desnaturação térmica (TABATA; IKADA, 1998). Por ser biodegradável, biocompatível e não imunogênico (DASH; FOSTON; RAGAUSKAS, 2013; GULLAPALLI, 2010; HUANG; FU, 2010), a gelatina é um composto adequado para biomedicina (KUIJPERS et al., 2000). É

geralmente utilizada na forma de cápsulas macias e como um veículo na liberação de drogas (GULLAPALLI, 2010; TABATA; IKADA, 1998).

A gelatina ainda não foi testada em embriões de peixes, mas apresenta características importantes, sendo assim, acredita-se que essa substância possa agir como crioprotetor extracelular.

2.7 Nanopartículas

A nanotecnologia refere-se ao desenvolvimento e manipulação de materiais em escala nanométrica, para criar novos produtos com diferentes e novas propriedades químicas e biológicas. Muitos nanomateriais não são naturais, como por exemplo, os nanotubos de carbono (CNT) (PATLOLLA; KNIGHTEN; TCHOUNWOU, 2010).

O conhecimento do efeito tóxico de nanopartículas sobre organismos aquáticos ainda é limitado. Utilizando nanopartículas de diferentes metais e comparando-as com nanopartículas orgânicas (fluoreno e carbono), foi observado que as compostas por metais apresentaram alto risco de toxicidade para os organismos aquáticos, sendo necessários maiores estudos para determinar os seus impactos (BLAISE et al., 2008).

Avaliando o potencial tóxico de diferentes concentrações de nanopartículas coloidais de prata e ouro em embriões de zebrafish (*Danio rerio*), foi observado alto grau de mortalidade embrionária. Porém, a prata mostrou-se mais tóxica que o ouro, determinando maior número de malformações morfológicas (BAR-ILAN et al., 2009). Esses autores determinaram que a química da nanopartícula é mais importante que o tamanho, para a indução de toxicidade embrionária.

Avaliando embriões de ratos expostos a nanopartículas de poliestireno, foi observado que, durante o desenvolvimento embrionário, essas estavam

aderidas ao trofoblasto e não apresentaram toxicidade aos sistemas orgânicos. Fato esse, comprovado devido a não observação de alterações na formação de blastocisto, implantação e degeneração embrionária, independente do tempo de exposição (BOSMAN et al., 2005).

Nanopartículas de poliestireno, marcadas com probes fluorescentes de diferentes tamanhos, penetraram no córion e no saco vitelino de embriões de medaka (*Oryzias latipes*), sendo que as partículas de 39,4 nm na concentração de 1 mg/L, foram as que apresentaram maior eficiência em se acumular nas gotículas lipídicas e no saco vitelino, demonstrando uma menor mortalidade embrionária (KASHIWADA, 2006).

Estudos sugerem que os nanomateriais, por sua pequena dimensão, podem ter uma permeabilidade maior através da pele, mucosas e membranas celulares, podendo também ter seu efeito tóxico aumentado, já que possuem uma reatividade superior, principalmente devido ao aumento da área superficial (PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010). Além disso, outros polímeros sintéticos como o poliestireno, muito utilizado para carrear drogas em sistemas biológicos (MCGILL; SMYTH, 2010), apresentam grande potencial crioprotetor, pela capacidade de penetração que esse tipo de nanopartícula apresenta.

Assim a capacidade de penetração das nanopartículas pode ajudar a corrigir alguns dos problemas citados, como por exemplo a semipermeabilidade das membranas e a dificuldade de penetração dos crioprotetores, possibilitar a inibição da formação de gelo, inibindo assim as crioinjúrias determinadas pelo processo, viabilizando o congelamento de embriões.

2.7.1 Nanotubos de carbono

Os nanotubos de carbono (NTCs) podem ser classificados em: NTCs de parede simples (SWCNT), compostos pelo enrolamento de uma única folha de grafeno, e NTCs de paredes múltiplas (MWCNT) compostos pelo conjunto de cilindros concêntricos, com espaçamento entre suas camadas de, aproximadamente, 0,34 nm (Figura 1) (DAI, 2002; FIRME; BANDARU, 2010).

Nanotubos de carbono de múltiplas paredes (MWCNTs) ganharam popularidade devido a sua estrutura única, unidimensional (oca) e suas propriedades físico-químicas (PATLOLLA; KNIGHTEN; TCHOUNWOU, 2010).

A estrutura dos átomos de carbono dos nanotubos lhes confere muita força, flexibilidade e resistência, caracterizando-os como materiais extremamente resistentes (SALVETAT, 1999). Recentemente, os NTCs surgiram ainda como opção em metodologias no tratamento do câncer, na bioengenharia e na terapia gênica (FIRME; BANDARU, 2010).

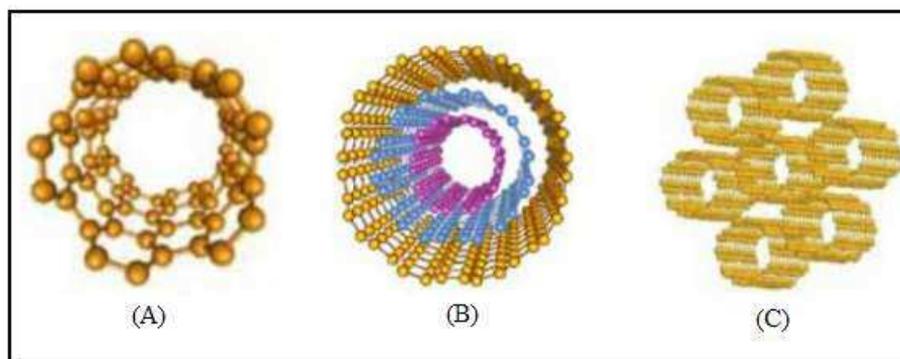


Figura 1 Imagem representativa dos nanotubos de carbono (a) de parede simples, (b) de paredes múltiplas, (c) agregados de nanotubos de carbono

Fonte: Mehl (2011)

Os NTC'S apresentaram capacidade de trafegar através de diferentes barreiras celulares (FIRME; BANDARU, 2010; ZHANG, 2007), sendo assim, poderiam constituir um crioprotetor que penetraria o embrião e o protegeria durante o congelamento e descongelamento. A endocitose/fagocitose e a nanopenetração são os dois mecanismos principais considerados para captação celular dos NTCs. A toxicidade desses compostos está relacionada principalmente aos danos causados ao DNA e o mecanismo de excreção desses compostos ainda é desconhecido (FIRME; BANDARU, 2010).

Cheng et al. (2009) microinjetaram BSA-MWCNTs e PPEI-EI-MWCNTs [Poly(propionylethylenimine-co-ethylenimine)] no sistema cardiovascular de *Danio rerio* e em embriões no estágio de 1 célula, e observaram que os MWCNTs modificados e purificados não exerceram efeitos tóxicos graves, confirmados pela ausência de deformações e malformações aos embriões, porém apresentam efeitos tóxicos a longo prazo.

Lindberg et al. (2013) avaliaram a genotoxicidade em células mesoteliais e células epiteliais brônquicas humanas tratadas *in vitro* com SWCNTs e MWCNTs curtas e purificadas nas concentrações 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 e 250 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ por 24, 48 e 72h e observaram os nanomateriais levaram ao aumento nos danos no DNA da linhagem de células mesoteliais, e apenas SWCNTs induziram danos no DNA das células epiteliais, sugerindo uma maior sensibilidade das mesmas.

A utilização de nanomateriais vem aumentando pela descoberta de suas diferentes aplicações, porém há poucos estudos que determinam o impacto biológico dessas sobre ambientes aquáticos. Esse impacto não necessariamente pode ser negativo, sendo uma alternativa para problemas importantes, como possibilitar o congelamento de embriões de peixes tropicais, ajudando a preservar espécies em extinção.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os resultados obtidos com a criopreservação de embriões ainda não são satisfatórios, todavia, possivelmente o protocolo definitivo não está longe de ser alcançado. Assim, a busca deve continuar e as tentativas devem ser inovadas com a ajuda de outras substâncias e de análises bioquímicas e morfológicas que caracterizem as causas e os efeitos de todo o processo.

Definir o protocolo de criopreservação vem de encontro à necessidade de se obter biotecnologias que assegurem a manutenção do material diploide e auxilie na produção de alimentos, pois é significativo o efeito causado às espécies de peixes, tanto pela sobrepesca e poluição, quanto pela construção de barragens que interferem no processo reprodutivo.

Trabalhos que forneçam informações e resultados sobre o comportamento dessas duas espécies economicamente e experimentalmente importantes, perante a toxicidade, o congelamento e a criopreservação de embriões são importantes e podem contribuir para o avanço dessa biotecnologia.

REFERÊNCIAS

AHAMMAD, M. M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B. B. Effect of different concentrations of cryoprotectant and extender on the hatching of indian major carp embryos (*Labeo rohita*, *Catla catla*, and *Cirrhinus mrigala*) stored at low temperature. **Cryobiology**, San Diego, v. 37, n. 4, p. 318-324, Dec. 1998.

AHAMMAD, M. M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B. B. Hatching of common carp (*Cyprinus Carpio* L.) embryos in response to exposure to different concentrations of cryoprotectant at low temperatures. **Cryobiology**, San Diego, v. 44, n. 2, p. 114-121, Apr. 2002.

AHAMMAD, M. M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B. B. Stage-dependent hatching responses of rohu (*Labeo rohita*) embryos to different concentrations of cryoprotectants and temperatures. **Cryobiology**, San Diego, v. 46, n. 1, p. 1-16, Feb. 2003.

ALBAREDA-SIRVENT, M.; ARBEN, M.; SALVADOR, A. Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors: a review. **Sensors and Actuators B**, Lausanne, v. 69, n. 1/2, p. 153-163, Sept. 2000.

ALI, A.; SIRARD, M. A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 66, n. 4, p. 901-905, Apr. 2002.

ANDRABI, S. M. H.; MAXWELL, W. M. C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 99, n. 3/4, p. 223-243, June 2007.

BAR-ILAN, O. et al. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. **Small**, Weinheim, v. 5, n. 16, p. 1897-1910, Aug. 2009.

BEDORE, A. G. **Características criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 1999. 53 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.

BLAISE, C. et al. Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms. **Environmental Toxicology**, New York, v. 23, n. 5, p. 591-598, Oct. 2008.

BOSMAN, S. J. et al. Development of mammalian embryos exposed to mixed-size nanoparticles. **Clinical and Experimental Obstetrico & Gynecology**, Padova, v. 32, n. 4, p. 222-224, 2005.

CARNEIRO, P. C. F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 361-366, jul./set. 2007.

CAROLSFELD, J. et al. Cryopreservation of sperm in brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, New York, v. 63, n. 2, p. 472-489, Aug. 2003.

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

CHENG, J. et al. Acute and long-term effects after single loading of functionalized multi-walled carbon nanotubes into zebrafish (*Danio rerio*). **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 235, n. 2, p. 216-225, Mar. 2009.

CUADRADO, E. E. H. et al. Extension of sperm motility leads to increased rates of fertilization and hatching in curimba, *Prochilodus lineatus*. **Journal of Applied Ichthyology**, Hamburg, v. 29, p. 1-5, June 2013.

DAI, H. Carbon nanotubes: synthesis, integration, and properties. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 35, n. 12, p. 1035-1044, Dec. 2002.

DAMMSKI, A. P. et al. **Zebra fish manual de criação em biotério**. Curitiba: UFPR, 2011. 106 p.

DASH, R.; FOSTON, M.; RAGAUSKAS, A. J. Improving the mechanical and thermal properties of gelatin hydrogels cross-linked by cellulose nanowhiskers. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 91, n. 2, p. 638-645, Jan. 2013.

DENNISTON, R. S. et al. Principles of embryo Cryopreservation. In: TIERSCH, T. R.; GREEN, C. C. (Ed.). **Cryopreservation in aquatic species**. 2nd ed. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2011. p. 483-502.

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, July 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.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Embrapa e a aquicultura: demandas e prioridades de pesquisa**. Brasília, 2002. 35 p. (Texto para Discussão, 11).

FELIZARDO, V. O. et al. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 122, n. 3/4, p. 259-263, Dec. 2010.

FIRME, C. P.; BANDARU, P. R. Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, New York, v. 6, n. 2, p. 245-256, Apr. 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of world fisheries and aquaculture 2010**. Rome, 2010. 197 p.

FORNARI, D. C. et al. Freezing injuries in the embryos of *Piaractus mesopotamicus*. **Zygote**, Cambridge, v. 19, n. 4, p. 345-350, Nov. 2011.

FREITAS, R. T. F. et al. **Reprodução/espécies para piscicultura**: cursos de qualificação profissional a distância. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002. 28 p.

FROESE, R.; PAULY, D. (Ed.). **Fishbase**. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>>. Acesso em: 22 ago. 2013.

GALDIOLI, E. M. et al. Substituição da proteína do farelo de soja pela proteína do farelo de canola em rações para alevinos de curimatá (*Prochilodus lineatus* V.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 31, n. 2, p. 552-559, mar./abr. 2000.

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

GULLAPALLI, R. P. Soft gelatin capsules: softgels. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 99, n. 10, p. 4107-4148, Oct. 2010.

HAGEDORN, M. et al. 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.

HAGEDORN, M.; KLEINHANS, F. W. Problems and prospects in cryopreservation of fish embryos. In: TIERSCH, T. R.; GREEN, C. C. (Ed.). **Cryopreservation in aquatic species**. 2nd ed. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2011. p. 483-502.

HOLT, C. B. The effect of antifreeze proteins and poly (vinyl alcohol) on the nucleation of ice: a preliminary study. **Cryo Letters**, London, v. 24, n. 5, p. 323-330, Sept./Oct. 2003.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, Woburn, v. 53, n. 1, p. 47-58, Jan. 2000.

HUANG, S.; FU, X. Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 142, n. 2, p. 149-159, Mar. 2010.

JACOB, S. W.; HERSCHLER, R. Introductory remarks: dimethylsulfoxide after twenty years. **Annals of The New York Academy of Sciences**, New York, v. 411, p. 13-17, Dec. 1983.

KAJJARI, P. B.; MANJESHWAR, L. S.; AMINABHAVI, T. M. Semi-interpenetrating polymer network hydrogel blend microspheres of gelatin and hydroxyethyl cellulose for controlled release of theophylline. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 50, n. 13, p. 7833-7840, May 2011.

KASHIWADA, S. Distribution of nanoparticles in the see-through medaka (*Oryzias latipes*). **Environmental Health Perspectives**, Raleigh, v. 114, n. 11, p. 1697-1702, Nov. 2006.

KUIJPERS, A. J. et al. Cross-linking and characterisation of gelatin matrices for biomedical applications. **Journal of Biomaterials Science. Polymer**, Utrecht, v. 11, n. 3, p. 225-243, Apr. 2000.

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.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 269, n. 1/4, p. 1-20, Sept. 2007.

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.

LIEBEL, S. et al. Cellular responses of *Prochilodus lineatus* hepatocytes after cylindrospermopsin exposure. **Toxicology in Vitro**, New York, v. 25, n. 1, p. 1493-1500, Oct. 2011.

LINDBERG, H. K. et al. Genotoxicity of short single-wall and multi-wall carbon nanotubes in human bronchial epithelial and mesothelial cells in vitro. **Toxicology**, Amsterdam, v. 313, n. 1, p. 24-37, Nov. 2013.

LOGATO, P. V. R. **Nutrição e alimentação de peixes de água doce**. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2000. 128 p.

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. 570-576, Feb. 2011.

MCGILL, S. L.; SMYTH, H. D. Disruption of the mucus barrier by topically applied exogenous particles. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v. 7, n. 6, p. 2280-2288, Dec. 2010.

MEHL, H. **Nanocompósitos formados por nanotubos de carbono, nanopartículas de prata e polianilina: síntese e caracterização**. 2011. 123 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

MENEZES, J. T. B. Avaliação espermática pós-descongelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 38, n. 2, p. 365-368, mar./jun. 2008.

MERYMAN, H. T.; WILLIAMS, R. T.; DOUGLAS, M. S. J. Freezing injury from “solution effect” and its prevention by natural or artificial cryoprotectant. **Cryobiology**, San Diego, v. 14, n. 3, p. 287-302, June 1977.

MURGAS, L. D. S. et al. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 526-531, 2007.

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. 2008.

NOWSHARI, M. A.; BREM, G. The protective action of polyvinyl alcohol during rapid-freezing of mouse embryos. **Theriogenology**, Woburn, v. 53, n. 5, p. 1157-1166, Mar. 2000.

PAES, M. C. F. **Viabilidade de embriões de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) submetidos a diferentes protocolos de resfriamento**. 2013. 58 p. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, São Paula, v. 33, n. 2, p. 421-430, jan. 2010.

PATLOLLA, A.; KNIGHTEN, B.; TCHOUNWOU, P. Multi-walled carbon nanotubes induce cytotoxicity, genotoxicity and apoptosis in normal human dermal fibroblast cells. **Ethnicity & Disease**, Atlanta, v. 20, n. 1, p. 65-72, 2010.

PAULINO, M. G.; SOUZA, N. E. S.; FERNANDES, M. N. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*.

Ecotoxicology and Environmental Safety, New York, v. 80, n. 6, p. 6-13, June 2012.

PENG, Z.; CHEN, F. Synthesis and properties of temperature-sensitive hydrogel based on hydroxyethyl cellulose. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, Washington, v. 59, n. 6, p. 450-461, Apr. 2010.

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

PEREIRA, L. et al. Hematological and biochemical alterations in the fish *Prochilodus lineatus* caused by the herbicide clomazone. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 36, n. 1, p. 1-8, July 2013.

PEREIRA, R. M.; MARQUES, C. C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell Tissue Bank**, Dordrecht, v. 9, n. 4, p. 267-277, Dec. 2008.

RALL, W. F. Recent advances in the cryopreservation of salmonid fishes. In: CLOUD, J. G.; THORGAARD, G. H. (Ed.). **Genetic conservation of salmonid fishes**. New York: Plenum, 1993. p. 137-158.

REIS, R. E.; KULLANDERS, S. O.; FERRARIS-JUNIOR, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUC, 2003. 719 p.

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

ROBLES, V. et al. Effect of a vitrification protocol on the lactate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities and the hatching rates in zebrafish (*Brachydanio Rerio*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos. **Theriogenology**, Woburn, v. 61, n. 7/8, p. 1367-1379, May 2004.

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

SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Meios de congelação para conservação de sêmen de peixes da Família Characidae. **Ciência Animal**, Forateza, v. 22, n. 1, p. 255-268, jun. 2012.

SALVETAT, J. P. Mechanical properties of carbon nanotubes. **Applied Physics A Materials Science & Processing**, Berlin, v. 69, n. 3, p. 255-260, Sept. 1999.

SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, Cambridge, v. 141, n. 1, p. 1-19, Jan. 2011.

SHAPIRO, Y. E.; SHAPIRO, T. I. ¹H NMR self-diffusion study of PVA cryogels containing ethylene glycol and its oligomers. **Journal Colloid Interface Science**, New York, v. 217, n. 2, p. 322-327, Sept. 1999.

STEPONKUS, P. L. et al. Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. **Nature**, London, v. 345, n. 6271, p. 170-172, May 1990.

STREIT, D. P. et al. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 8, p. 1119-1202, ago. 2007.

SUGIMOTO, H. Growth and development of rabbit oocytes *in vitro*: effect of fetal bovine serum concentration on culture medium. **Theriogenology**, Woburn, v. 78, n. 5, p. 1040-1047, Sept. 2012.

TABATA, Y.; IKADA, Y. Protein release from gelatin matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 287-301, May 1998.

TETZNER, T. A. D. **Efeitos da substituição do soro fetal bovino (SFB) e da albumina sérica bovina (BSA) pela ovalbumina (OVA) na produção *in vitro* de embriões bovinos.** 2007. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2007.

TSAI, S.; LIN, C. Advantages and applications of cryopreservation in fisheries science. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 55, n. 3, p. 425-433, June 2012.

VAJTA, G. et al. The effect of media, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after open pulled straw (ops) vitrification. **Theriogenology**, Woburn, v. 52, n. 5, p. 939-948, Oct. 1999.

VARELA JUNIOR, A. S. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Theriogenology**, Woburn, v. 78, n. 2, p. 244-251, July 2012.

VIVEIROS, A. T. M. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba (*Prochilodus Lineatus*) (Characiformes) sêmen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 105, n. 3/4, p. 293-300, June 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.

WILLADSEN, S. M.; POLGE, C.; ROWSON, L. E. Deep-freezing of sheep embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 46, n. 1, p. 151-154, Jan. 1976.

WOELDERS, H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. **Veterinary Quarterly**, Boston, v. 19, n. 3, p. 135-138, Sept. 1997.

WOELDERS, H.; ZUIDBERG, C. A.; HIEMSTRA, S. J. Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: poultry perspective. **Poultry Science**, Menasha, v. 85, n. 2, p. 216-222, Feb. 2006.

WOODS, E. J. Equations for obtaining melting points for the ternary system ethylene glycol/sodium chloride/water and their application to cryopreservation. **Cryobiology**, San Diego, v. 38, n. 4, p. 403-407, June 1999.

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

WUSTEMAN, M.; ROBINSON, M.; PEGG, D. Vitrification of large tissues with dielectric warming: biological problems and some approaches to their solution. **Cryobiology**, San Diego, v. 482, n. 2, p. 179-189, Apr. 2004.

ZHANG, T. Low temperature preservation of fish gonad cells and oocytes. In: BADIN, P. J.; CERDÀ, J. E.; LUBZENS, E. (Ed.). **The fish oocytes: from basic studies to biotechnological applications**. New York: Springer, 2007. p. 411-436.

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

ZULKIFLI, F. H. Cross-linking effect on electrospun hydroxyethyl cellulose/poly (vinyl alcohol) nanofibrous scaffolds. **Procedia Engineering**, New York, v. 53, p. 689-695, 2013.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**ARTIGO 1 Toxicity of cryoprotectants for curimba (*Prochilodus lineatus*) embryos in experimental incubator
(Characiformes: Prochilodontidae)**

**Artigo formatado de acordo com as normas para submissão da Revista
Neotropical Ichthyology**

Daniella A. J. Paula¹, Mônica R. F. Machado², Luis D. S. Murgas³,
Denílson Rabelo⁴, Márcio G. Zangerônimo³, Rafael V. R. Neto⁵,
Estefânia S. Andrade³ and Eliane A. Andrade³

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Zootecnia, Campus
Universitário, 37200-000, Lavras, MG, Brazil.

daniufla2002@yahoo.com.br (DAJP)

²Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Av. Universitária, 74605010,
Goiânia, GO, Brazil. monicavet_2@hotmail.com (MRFM)

³Universidade Federal de Lavras, Departamento de Medicina Veterinária,
Campus Universitário, Centro, 37200-000 Lavras, MG, Brazil.

lsmurgas@ufla.br (LDSM), esandrade@bol.com.br (ESA),

eandrade70@yahoo.com.br (EAA)

⁴Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química, IQII, 74001970, Goiânia, GO, Brazil. rabelo.denilson@gmail.com (DR)

⁵Universidade Estadual Paulista, Campus Experimental de Registro, Nelson Brihi Badur, 11.900-000 Registro, SP, Brazil. rafaneto2003@yahoo.com.br (RVRN)

This study investigated the effect of cryoprotectant substances for curimba (*Prochilodus lineatus*) embryos in experimental incubator. The experiment was conducted at the environmental station of CEMIG, in Itutinga-MG, Brazil, between December/2010 and February/2011. Embryos (6±1g) from each curimba's couple (n=6) were collected, transferred to experimental incubators (0.4 L) with medium for embryo and with: 0.5% polyvinyl alcohol (PVA)+dimethyl sulfoxide (DMSO); 0.5% PVA+Ethylene glycol (ET); 1% PVA+DMSO; 1% PVA+ET; 0.5% hydroxyethyl cellulose (HEC)+DMSO; 0.5% HEC+ET; 1% HEC+DMSO; 1%HEC+ET; 0.5% gelatin (GEL)+DMSO; 0.5% GEL+ET; 1% GEL+DMSO; 1% GEL+ET; 4% fetal bovine serum (BSF)+DMSO; 4% BSF+ET; 8% BSF+DMSO; 8% BSF+ET and Control (water). The concentration of DMSO and ET was 3%. During 8h,

embryos were kept in cryoprotectants and images were captured of three embryos per treatment in 15, 30 and 60 min of exposition and considered measures the medium diameter chorio and medium diameter embryo, to evaluate the effect of cryoprotectants on embryo morphology (hydration / dehydration) by input and output. After 8h, the embryos were transferred to incubators (1L) with constant circulation of water, until hatching. The temperature, oxygen and fertilization rate from funnel and experimental incubators were measured, as well viability of larvae exposed to treatments in experimental incubators. The association between 3% DMSO and 1% HEC showed viability for the embryos (72.9%) ($p<0.05$), the medium diameter chorio and medium diameter embryo was affected by cryoprotectants in different times ($p<0.05$) and experimental incubators can be used like models because showed high fertilization rate (79.6%) ($p<0.05$).

Este estudo avaliou o efeito de substâncias crioprotetoras para embriões de curimba (*Prochilodus lineatus*) em incubadora experimental. O experimento foi conduzido na Estação Ambiental da CEMIG, em Itutinga-MG, entre Dezembro/2010 e Fevereiro/2011. Embriões (6 ± 1 g)

de cada casal (n=6) foram coletados e transferidos para incubadoras experimentais (0.4 L) contendo meio para embrião e as seguintes substâncias: 0.5% álcool polivinílico (PVA)+dimetilsulfóxido (DMSO); 0.5% PVA+Etilenoglicol (ET); 1% PVA+DMSO; 1% PVA+ET; 0.5% hidroxietilcelulose (HEC)+DMSO; 0.5% HEC+ET; 1% HEC+DMSO; 1%HEC+ET; 0.5% gelatina (GEL)+DMSO; 0.5% GEL+ET; 1% GEL+DMSO; 1% GEL+ET; 4% soro fetal bovino (BSF)+DMSO; 4% BSF+ET; 8% BSF+DMSO; 8% BSF+ET e Controle (água). A concentração de DMSO e ET foi de 3%. Durante 8h, os embriões foram mantidos nos crioprotetores e imagens foram capturadas de três embriões por tratamento em 15, 30 e 60 min de exposição e considerados o diâmetro médio do cório e diâmetro médio do embrião, para avaliar o efeito dos crioprotetores na morfologia do embrião (hidratação/desidratação) pela entrada e saída dos mesmos. Depois de 8h, os embriões foram transferidos para incubadoras (1L) com circulação de água constante, até a eclosão. A temperatura, oxigênio e taxa de fertilização das incubadoras tipo funil e experimentais foram mensuradas e também a viabilidade das larvas expostas aos tratamentos nas incubadoras experimentais. A associação entre 3% DMSO e 1% HEC

mostrou alta viabilidade dos embriões (72.9%) ($p < 0,05$), o diâmetro médio do cório e o diâmetro médio do embrião foram influenciados pelos crioprotetores nos diferentes tempos ($p < 0,05$) e as incubadoras experimentais podem ser usadas como modelo devido a alta taxa de fertilização (79.6%) ($p < 0,05$).

Key words: conservation, fertilization, freshwater fish, morphology, reproduction.

Introduction

The piracema fish are a significant portion of the Brazilian fish fauna and their reproduction occurs once a year, and they not only require programs to recover rivers, but also programs for the reproduction of these species in captivity by artificial propagation and reintroduction (Murgas *et al.*, 1997; Viveiros *et al.*, 2010). Cryopreservation of embryos is an alternative for the conservation of endangered species and this technique allows the maintenance for long periods of the cells in liquid nitrogen, preserving genetic material.

The curimba (*Prochilodus lineatus*) is a migratory native species of South America (Viveiros *et al.*, 2009) used in commercial polycultures and for fishing subsistence or commercialization (Maduenho & Martinez, 2008). As a migratory species, curimba needs to swim upriver to spawn and this cycle has been drastically affected (Paula *et al.*, 2012), being cryopreservation a biotechnology for their conservation and a tool for assisted reproduction in large scales.

However, this technique does not present an effective protocol, mainly due to difficulties in developing substances that penetrate the chorionic sac and protect the embryo from formation of intracellular ice crystals during the procedure (Kusuda *et al.*, 2002; Ninhaus-Silveira *et al.*, 2009). According to Ninhaus-Silveira *et al.* (2009), teleost fish embryos have a great amount of yolk and they have a final large size, a low surface/volume ratio, different osmotic properties in each compartment, semi-permeability of membranes surrounding embryos and high sensitivity to low temperatures. These characteristics make it difficult the dehydration of the embryo and penetration of cryoprotectants substances, which facilitates the formation of intracellular crystals during cryopreservation.

Various cryoprotectant solutions have been used in different protocols tested with different results. For zebrafish (*Brachidanio rerio*), 2M methanol proved to be more effective and less toxic (Zhang *et al.*, 1993). For curimba, 1.5 M of dimethyl-sulfoxide and propylene glycol proved to be less toxic, promoting the highest percentage of survival (78.95%), after toxicity assays, but no embryos survive after cryopreservation (Ninhaus-Silveira *et al.*, 2009).

Sucrose and methanol were tested on cryopreservation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*), solutions with 8.5%, 17%, 25.5% e 34% of sucrose associated with 9% methanol determined a reduced level of injury on morphological structures of fish embryo, although no embryo survived after freezing (Fornari *et al.*, 2011). The use of 10% methanol associated with 0.5M sucrose resulted in 49% of larvae survival, when was performed the cooling, in embryos in blastoporous closure (Lopes *et al.*, 2011).

Substances such as polyvinyl alcohol (Naitana *et al.*, 1997; Wowk *et al.*, 2000; Checura & Seidel Jr, 2007) and fetal bovine serum (Vajta *et al.* 1999) have been successfully tested in freezing embryos of mice, sheep and cattle. These solutions have hydrophilic properties that

contribute to the removal of water from inside the embryos (Nowshari & Brem, 2000). In addition, substances such as hydroxyethyl cellulose and gelatin, have not been tested on embryos of any specie, but present characteristics of cryogels which have complex structures, having porous compartmented which are originated from a gelation of the concentrated aqueous solution (Shapiro & Shapiro, 1999).

If fish embryo has multicompartmentalized structures that difficult the exchange of water/cryoprotectant and during their early stages are more permeable (Martínez-Páramo et al., 2008, Martínez-Páramo *et al.*, 2009), so the exposure time to cryoprotectant on the protocols, the fresh embryos are typically exposed for only few minutes, at ambient temperature, after the closure of blastopore (8 h pos fertilization) and passed through the cooling (Lopes *et al.*, 2011). The novel models of incubators could permit the maintenance of embryos in cryoprotective environment, combined with a suitable environment for embryo development.

Thus the objective study was to investigate the effect of cryoprotectant substances in curimba's embryos in experimental incubator, allowing a longer period of exposure to external

cryoprotectants polyvinyl alcohol, hydroxyethyl cellulose, gelatin and fetal bovine serum associated with internal cryoprotectants ethylene glycol or dimethylsulfoxide.

Material and Methods

Animals and incubation

The experiment was conducted from December 2010 to February 2011 at the Estação Ambiental de Itutinga da Companhia Energética de Minas Gerais (Itutinga Environmental Station of the Companhia Energetica de Minas Gerais) (EAI-CEMIG), located in the city of Itutinga, Minas Gerais. For the experiment, 6 pairs of curimba (mean weight females: 1191 ± 496 g and mean weight males: 675 ± 296 g), wild fish, kept in inland hatcheries in station for maximum three years, were used, ready to reproduce, selected by abdominal massage to check the release of sperm in males and evaluation of the urogenital papillae in females (prominent with pinkish or reddish coloration and genital orifice slightly open). During the breeding season the females have their belly bulging and are removed from water for visualization of the papilla, in

case the papilla present the reddish color it is selected for application of hormones.

The specimens were sent to masonry aquariums and received hormonal application of crude extract of carp pituitary gland. The initial and final doses of hormone used were 0.5 and 5 mg/Kg of fish and 0.4 and 4 mg/Kg of fish, for females and males respectively. The application of the hormone was done intramuscularly and near the base of the dorsal fin, at intervals of 12 h (Murgas *et al.* 1997, Ninhaus-Silveira *et al.* 2006).

After 24 h of the initial dose, the urogenital papillae were cleaned and dried with paper towels to prevent contamination and activation of gametes with water, urine or feces. Then hand massage was performed gently in the coelomic wall in cranial-caudal orientation to promote the release of gametes (Spawning 214 ± 66.61 g; sperm: 2.83 ± 1.72 mL).

The fertilization of gametes was performed with the addition of water from the tank itself. The amount 6 ± 1 g of embryos from each curimba couple were weighted and then taken to incubators containing the experimental treatments in Section “Effect of cryoprotectant” where they remained for 8 h.

The experimental incubators were made with of polyvinyl chloride tubes (PVC) (6 cm diameter, 10 cm high and 400 mL capacity) and these were arranged on a wooden support compatible with the pipe size. The incubators were supplied with oxygen through a tank aeration sponge, centered on the PVC pipe and connected to oxygen inhalers (Aquarium Air Pump, Power_{TM} 100) through hoses suitable for aquariums (Fig. 1). The incubators system is a closed system without recirculation of water, only with constant aeration thus maintaining the concentration of cryoprotective agents and compared the funnel incubator.

The Núcleo de Inovação Tecnológica - NINTEC/UFLA, conducted prior art searches in the national banks and international patents to validate the uniqueness of the technology entitled "Sistema de Incubação Experimental para Embriões de Peixe" and as the provisions of Law 9.279, of May 14, 1996 - which regulates the rights and obligations relating to Industrial Property, the technology attended the necessary prerequisites for patenting. The technology has been deposited to INPI, on 12/07/2013, under nº BR 10 2013 017858 6, period of secrecy of the Institution for 18 months. The copy of the filed process was archived at

Núcleo de Inovação Tecnológica - NINTEC/UFLA for purposes of evidence.

Fig 1.

The temperature and oxygen in the experimental incubators were measured every hour for 10 h. The temperature and oxygenation of the incubators type funnel (200 L), of glass fiber, tubular, in support tripod type, with constant circulation of water at 26.98 ± 1.05 °C during experiment. Incubators type funnel are commonly used in commercial fish farms were also checked and used as control. The fertilization rate of both incubators was measured approximately 8 h after fertilization of gametes, using the relationship between the number of good embryos and overall embryo counted in a sample (200 embryos), multiplied by 100.

Subsequent to exposure time (8 h), the embryos were transferred to commonly used 1L incubators (Felizardo *et al.*, 2010) in a masonry tank with constant water circulation and oxygenation to complete their development. After hatching, the larvae were evaluated in stereomicroscope, and the total number of viable larvae was counted (hatched and not deformed).

Effect of cryoprotectant

Four substances, polyvinyl alcohol (PVA), the hydroxyethyl cellulose (HEC), gelatin (GEL) in concentration of 0.5% and 1% and fetal bovine serum (BSF) in concentration of 4 and 8% were tested and combined with dimethyl sulfoxide (DMSO) and Ethylene glycol (ET), both in concentration of 3%. The substances tested in this study have the potential to external cryoprotectant by its degradability and form gels. The solutions were added to a medium (160 mL) to develop embryos, E3, composed by: 8.6 g NaCl, 0.38 g KCl, 1.46 g of CaCl₂ and MgSO₄ 2.45 (Di Prinzio *et al.*, 2010; Haffter *et al.*, 1996). An additional treatment containing only water from the recirculation system was used as control to compare the solutions that were prepared 12 hs prior for components stabilization.

Morphometric analysis

During eight hours while the embryos were kept in cryoprotectants and captured images of three embryos per treatment in 15, 30 min and 60 min of exposition. After capturing, these images were evaluated in the IMAGE J. For morphology were considered measures

the medium diameter chorio (CD) and the medium diameter embryo (ED) in μm .

Statistics

The experimental randomized blocks design (RBD) was used with repeated treatments, and 6 blocks. The treatments were arranged in a $4 \times 2 \times 2 + 1$ factorial structure (substances, concentrations of substances, internal cryoprotectants and control). To evaluate the effect of the incubators a completely randomized design was adopted with two treatments, experimental and funnel type incubators, with eight replicates.

The results obtained for percentage viable larvae were submitted to nonparametric statistical analysis using the computer package SAS (1999) and in case of significant effect, the Kruskal-Wallis test was applied at 5% significance level. For the variables temperature, oxygen, fertilization rate in the incubators, ANOVA was conducted and in case of significant effect the means were subjected to the Scott-Knott test and for morphometric analysis, ANOVA was conducted and in case of significant effect the means were subjected to the Dunnett test.

Results

The rate fertilization was not different between the incubators ($p>0.05$). Temperature in the funnel type incubators were higher ($p<0.05$) than in experimental incubators and also dissolved oxygen in the funnel type incubators was higher ($p<0.05$) than in the experimental incubators during the time of evaluation (Table 1).

Table 1.

The treatments consisting of 3% DMSO combined to 0.5 and 1.0 % PVA, 0.5% GEL and 1.0% HEC had a higher percentage ($p<0.05$) of viable larvae in relation to the use of ET for the same combinations, but the HEC 1.0% was the better when combined with 3% DMSO. It was observed that during the embryos exposure of HEC, they had dehydration without breaking the membrane. The use of DMSO combined to HEC 1.0% showed similar results ($p>0.05$) for the percentage of viable larvae when compared to control. On the other hand, it was observed that the other treatments were lower ($p<0.05$) than the control group.

When DMSO was used as internal cryoprotectant, the highest ($p<0.05$) percentage of viable larvae were obtained with combinations to 1.0% HEC, compared to the combinations of 0.5% HEC, 1.0% gelatin,

BSF 4% and 8% and 0.5% PVA. No differences were observed between the other treatments. With the use of ET, the combined to 1.0% gelatin presented higher ($p<0.05$) percentage of viable larvae in relation to BSF 8% and 0.5% PVA. However, no significant differences ($p>0.05$) were observed between the other treatments (Table 2).

Table 2.

The medium diameter chorio (CD) submitted to 15 minutes of cryoprotectans was decreased ($p<0.05$) for DMSO PVA 1.0%, ET PVA 1.0%, DMSO PVA 0.5%, ET GEL 1.0%, ET HIDR 1%, ET HIDR 0.5%, DMSO BSF 8%, ET BSF 8%, DMSO BSF 4% and ET BSF 4% compared to the control. The CD submitted to 30 min of cryoprotectans was decreased ($p<0.05$) to the control for DMSO PVA 0.5%, DMSO BSF 8%, ET BSF 8% and ET BSF 4% and was increased ($p<0.05$) to the control for all others treatments except for ET GEL 1.0%, DMSO GEL 0.5%, ET GEL 0.5% and DMSO BSF 4% that did not present significant different ($p>0.05$). The CD submitted to 60 min of cryoprotectans was decreased ($p<0.05$) to the control for DMSO PVA 1.0%, ET PVA 1.0%, DMSO PVA 0.5%, ET BSF 8%, DMSO BSF 4% and ET BSF 4% and was increased ($p<0.05$) to the control for all others

treatments except for ET GEL 1.0% and DMSO BSF 8% that did not present significant difference ($p>0.05$) when compared at control (Table 3).

Table 3.

The medium diameter embryo (ED) submitted to 15 min of cryoprotectants was increased ($p<0.05$) to the control for all treatments except for DMSO PVA 1.0%, ET PVA 1.0%, DMSO PVA 0.5%, ET GEL 1.0%, ET HID 0.5%, ET BSF 4%. The ED submitted to 30 min of cryoprotectants was increased ($p<0.05$) to the control for DMSO PVA 1.0%, ET PVA 1.0%, DMSO GEL 1%, DMSO HID 0.5%. The diameter embryo (ED) submitted to 60 min of cryoprotectants was decreased ($p<0.05$) to the control for DMSO PVA 0.5%, ET PVA 0.5%, DMSO GEL 1.0%, ET GEL 1.0%, ET HID 0.5%, ET HID 1.0%, DMSO BSF 8%, DMSO BSF 4% and ET BSF 4% and was increased ($p<0.05$) to the control for ET BSF 8% (Table 4).

Table 4.

Discussion

Fertilization success is probably one of the earliest estimators that can be recorded to accurately estimate egg quality and it is the most integrative estimator of sperm quality. Indeed, the ability to fertilize or be fertilized is one of the key components of gamete quality. Recording of fertilization rates is relatively easy in some species, due transparent eggs (Bobe & Labbé, 2010). Our results show high fertilization rates in both incubators and can be considered satisfactory in a system of artificial reproduction in the case of funnel type incubators and the experimental system as in the case of experimental incubators. The experimental incubators are advantageous because allow normal development of embryos in solutions with fixed concentrations and requiring little space.

The fact of temperature in the funnel type incubators were higher than in experimental incubators may be attributed to the conditions in which the funnel type incubators are used, as they receive water from a tank with heating system and constant renewal, which keeps the temperature. However, the experimental incubators had no exchange of water or heating system and were controlled by room temperature. The lower the temperature oscillation leads to a lower frequency of heat

shocks, which can help the overall performance of the incubation of eggs and larvae (Johnston & Vieira, 1996).

The time difference for embryonic development may be directly related to incubation temperature (Saka *et al.*, 2004). This fact was observed for curimba embryos with development in average temperature of 24°C and 28°C, where the hatching occurred 22 and 14 h after fertilization, respectively (Rodrigues-Galdino *et al.*, 2009). As the temperatures were very close to the comfort range, our larvae took less time to hatch, but the incubation continued viability of the larvae, which can be observed in satisfactory development rates.

According to Rodrigues-Galdino *et al.* (2009) water temperature is a major determining factor in fish development. It is always advisable to use an optimal temperature for the species in this work. Studies show that the acceptable range for the incubation of eggs of tropical fish varies from 22°C to 31°C, and the best temperature at 27°C (Johnston & Vieira, 1996). All temperatures in both incubators were around this comfort range for most of the evaluated period.

The dissolved oxygen in the funnel type incubators was higher than in the experimental incubators during the time of evaluation that may

also be justified by the conditions in which the funnel type incubators are used, as they have constant water renewal and oxygenation. However, this difference in oxygen concentration did not affect embryo viability. Studies show that the oxygen consumption by the eggs is very low in the early stages of development, gradually accelerating its demand (Strecher *et al.*, 2011). The oxygen demand of the developing embryo increases dramatically with temperature, i.e., dissolved oxygen should not be separated from other factors synchronous with temperature, pH, and altitude, among others (Barroso & Santos, 2006).

The DMSO is a widely used cryoprotectant during the cooling processes, both for the cryopreservation of semen and embryos. This cryoprotectant has as an advantage the rapid permeation into the plasma membrane, especially at low temperatures, however, it is capable of causing changes in membrane which may damage and make the cell unviable, making it particularly toxic (Wolfe & Bryant, 2001). Our study with the DMSO showed lower toxicity during incubation of the embryo for longer periods when compared to ethylene glycol, being the cryoprotectant indicated in these conditions.

The fact that the internal cryoprotectant 3% ET has shown a lower percentage of viable larvae in relation to the 3% DMSO, combined to 0.5 and 1.0% PVA, 1.0% HEC and 0.5% GEL can be related to the detrimental effect of the cryoprotectant, because it could interfere with the metabolism of the embryo causing cell disruption and consequently death (Streit-Júnior *et al.*, 2007). This results are in agreement with those obtained by Zhang *et al.* (2005) evaluating the toxicity of different cryoprotectants on flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos, which had the lowest percentage of live embryos using ET, compared to DMSO, glycerol, propylene glycol and methanol, all at concentrations of 10, 15, 20, 25, 30%, under exposure for 60 min, with this effect being dose dependent.

The fact that HEC determines higher rates of embryo viability shows that this polymer may be presented as a future solution for cryopreservation. Mainly because it has the viscosity of various products that are used and have low freezing temperature, according to the manufacturer. Based on results of the present work, we can assume that this substance had a lower toxicity to the embryos. Probably our work is the first in describing the use of this substance during the embryonic

development in this specie. The HEC is a natural polysaccharide and the beneficial effect this compound is probably due to its properties nontoxicity, biocompatibility, and biodegradability (Peng & Chen, 2010). Dehydration was observed for the embryos of ET HID 1.0% and ET HID 0.5% and did not to other treatments during the first 15 min, which may be due to the action of internal cryoprotectants and after this period, the embryos were hydrated in all treatments in 30 and 60 min of exposure. However, hydration can be a barrier to cryopreservation where dehydration is expected to prevent formation of intracellular ice.

On the other hand, the ED of the embryos exposed to certain combinations HEC increased during the first 15 min, similar results can be observed by Lahnsteiner (2008), observed for zebrafish (*Danio rerio*) that the diameter of the yolk increased after 5 min exposure with DMSO and sucrose solutions and conclude this process was coupled with the shrinkage of the perivitelline space and speculated that during shrinkage the egg loses its tension enabling the yolk to expand and during further incubation the re-increase in the width of the perivitelline space and in the egg tension could have led to re-compression of the yolk.

Although the PVA did not show satisfactory results when compared to other treatments, this substance may play an important role as external cryoprotectant, mainly for its degradability and non-toxicity properties (Batyrbekov *et al.*, 1998). The use of cryo-gels has shown increased viability of smooth muscle cells, when combined to DMSO (Vrana *et al.*, 2011), there are studies that prove the reduction in the ice crystals formation, derived from freezing (Holt, 2003). Our results also show the beneficial effects of these cryoprotectants for freezing, explained by CD, combinations of cryoprotectants internal PVA induced loss of water in the embryo at 15 min (except ET PVA 0.5%), and this behavior continued throughout the 30 and 60 min, including the treatment ET PVA 0.5%. Evaluating the ED some of the embryos exposed to combinations of PVA which were increased at 15 and 30 min and only 2 treatments led to dehydration at 60 min (DMSO PVA 0.5% and ET PVA 0.5%). PVA is a biomaterial for potential biomedical applications, designing new nanostructured devices, water soluble, biocompatible and has physical properties (Paradossi *et al.*, 2003), like rubbery nature and high degree of swelling in water (Nikolaos & Stauffef, 1991)

Gelatin associated to ET resulted in higher rates of viable larvae when compared to 8% BSF. Gelatin is a composite of essential and nonessential amino acids that may have contributed to the nutrition of the embryos without being highly toxic. Furthermore, gelatin is used as delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules (Young *et al.*, 2005) and used for pharmaceutical and medical applications because of its biodegradability (Tabata & Ikada, 1998).

The results of CD and ED with gelatin were very variable, but we observe compensation between two measures, similar results can be observed in zebrafish by Lahnsteiner (2008) that the re-increase in the width of the perivitelline space and in the egg tension could have led to re-compression of the yolk that. The BSF is a compound of bovine blood proteins and may have been toxic to curimba embryos, a fact which is not observed for bovine embryos, providing an increase in the growth of these (Lonergan *et al.*, 1999).

The BSF in association with ET may have caused the change in the homeostasis of embryos, and some authors report a low potential for detoxification of regulatory pathways in early ontogenetic stages since these phases the embryos are still undeveloped, being unable to

compensate for the toxic effect of cryoprotectants (Lahnsteiner, 2008). It was observed during this study, using 4 and 8% fetal bovine serum, led to severe dehydration of the embryos, which we believe has been deleterious to them.

The BSA and FCS (fetal calf serum or BSF) are commonly used in freezing solutions at 4 mg/mL or 10%, respectively in bovine embryos, and according to Gordon (1994) are widely used in the freezing medium as extracellular cryoprotectants. The study of Pugh *et al.* (1998) compared the addition of fetal bovine serum and fetal serum albumin (BSA) in the culture medium of bovine embryos and observed that the survival of late morulae/early blastocysts following freezing was improved in the presence of additional BSA but not BSF in vitro Embryos-produced. Dehydration of the embryo before freezing would be interest for the cryopreservation process of fish embryos, thereby avoiding the formation of intracellular ice.

Our results for CD and ED show that BSF matched with cryoprotectants internal dehydrates the embryos during the majority of the exposure time and force the water outlet of the embryo and consequently its dehydration. Thus, the use of fetal bovine serum before freeze drying

may cause this during a short exposure because for 8 h, the survival of damaged curimba embryos.

The lack of success of cryopreservation fish embryos may be related the lower permeability of the embryonic membranes (Hagedorn *et al.*, 1997), which don't permit entry water or inlet of cryoprotectant. Thus, the embryos exposed to low concentrations of cryoprotectant internal (3% would be less toxic), throughout the period of embryonic development from fertilization to 8 h approximately, when closing occurs blastopore (Botta *et al.*, 2010), possibly allowing for greater input cryoprotectant in all compartments embryonic.

Conclusion

The combinations of tested cryoprotectants maintained the viability of curimba embryos except for the combination ethylene and 8% BSF. The use of the combination DMSO and 1.0% HEC is suggested as a potential solution for embryo cryopreservation since it has lower toxicity. The use of reduced model of experimental incubators is an alternative for studies on toxicity of cryopreservation solutions over embryo development, for long periods, maintaining their viability.

Acknowledgments

Thanks to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Foundation for Research Support of Minas Gerais), for financial support, to the Estação Ambiental de Itutinga, da Companhia Energética de Minas Gerais (Itutinga Environmental Station of the Companhia Energetica de Minas Gerais) (EAI-CEMIG) for their support in the development of this work, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (Graduate Program in Animal Science of the Universidade Federal de Lavras) for the support and to Capes and CNPq for the financial support.

Literature Cited

- Barroso, H. G. & A. J. G. Santos. 2006. Incubadora HB para ovos de peixes de água doce e sua larvicultura (PATENTE: MU 7903279-6*). Revista Brasileira de Engenharia de Pesca, 1: 119-143.
- Batyrbekov, E. O., R. Iskakov & B. A. Zhubanov. 1998. Synthetic and natural polymers as drug carriers for tuberculosis treatment. Macromolecular Symposia, 127: 251-256.

- Bobe, J. & C. Labbé. Egg and sperm quality in fish. 2010. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 535-548.
- Botta, P., A. Sciara, S. Arranz, L. D. S. Murgas, G. J. M. Pereira & G. Oberlender. 2010. Estudio del desarrollo embrionario del sábalo (*Prochilodus lineatus*). *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42: 109-114.
- Checura, C. M. & G. E. Seidel Jr. 2007. Effect of macromolecules in solutions for vitrification of mature bovine oocytes. *Theriogenology*, 67: 919-930.
- Di Prinzio, C. M., Botta, P. E., Barriga, E. H., Ríos, E. A., Reyes, A. E. & Arranz, S. E. 2010. Growth hormone receptors in zebrafish (*Danio rerio*): adult and embryonic expression patterns. *Gene Expression Patterns*, 10: 214-225.
- Felizardo, V. O., L. D. S. Murgas, M. M. Drumond & J. A. Silva. 2010. Dose inseminante utilizada na fertilização artificial de ovócito de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), *Revista Ceres*, 57: 648-652.
- Fornari, D. C, R. P. Ribeiro, D. P. Streit Jr, L. Vargas, N. M. L. Barrero & G. V. Moraes. 2011. Freezing injuries in the embryos of *Piaractus mesopotamicus*. *Zygote*, 19: 345-350.

Gordon, I. 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos. CAB International.

n°11. Cambridge: UK at the University Press, 1994. 640p.

Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Odenthal, J., Van Eeden, F. J. M., Jiang, Y., Heisenberg, C., Kelsh, R. N., Furutani-Seiki, M., Vogelsang, E., Beuchle, D., Schach, U., Fabian, C. & Nüsslein-Volhard, C. 1996. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, 123: 1-36.

Hagedorn, M., E. W. Kleinhans, D. E. Wildt, & W. E. Rall. 1997.

Chilling sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebra fish embryos, *Brachidanio rerio*. *Cryobiology*, 34: 251-63.

Holt, C. B. 2003. The effect of antifreeze proteins and poly(vinyl alcohol) on the nucleation of ice: A preliminary study. *Cryo Letters*, 24: 323-330.

Johnston, I. A. & V. L. A. Vieira. 1996. Larval development in the tambaqui (*Colossoma macropomum*) and the curimatã-pacú (*Prochilodus marggravii*). University of St. Andrews 43-55.

Kusuda, S., T. Teranishi & N. Koide. 2002. Cryopreservation of chum salmon blastomeres by the straw method. *Cryobiology*, 45: 60-67.

- Lahnsteiner, F. 2008. The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology*, 69: 384-396.
- Lonergan, P., M. O'Kearney-Flynn & M. P. Bolanda. 1999. Effect of protein supplementation and presence of antioxidant on the development of bovine zygotes in syntenic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. *Theriogenology*, 51: 1565-1576.
- Lopes, T. S., E. Romagosa, D. P. Streit Jr, R. P. Ribeiro & M. Digmayer. 2011. Cooling of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos at various stages of development for 6 or 10 hours. *Theriogenology*, 75: 570–576.
- Maduenho, L. P. & C. B. R. Martinez. 2008. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 148: 265-272.
- Martínez-Páramo, S., S. Pérez-Cereales, V. Robles, L. Anel & M.P. Herráez. 2008. Incorporation of antifreeze proteins into zebrafish embryo by a non-invasive method, *Cryobiology*, 56: 216-222.
- Martínez-Páramo, S., V. Barbosa, S. Pérez-Cereales, V. Robles & M.P. Herráez. 2009. Cryoprotective effects of antifreeze proteins delivered into zebrafish embryos. *Cryobiology*, 58: 128-133.

- Murgas, L. D. S., A. B. Miliorini, R. T. F. Freitas & G. J. M. Pereira. 1997. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. Revista Brasileira de Zootecnia, 36: 526-531.
- Naitana, S., S. Ledda, P. Loi, G. Leoni, L. Bogliolo, M. Dattena & P. Cappai. 1997. Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. Animal Reproduction Science, 48: 247-256.
- Nikolaos A. P. & S. R. Stauffer. 1991. Reinforced uncrosslinked poly (vinyl alcohol) gels produced by cyclic freezing-thawing processes: a short review. Journal of Controlled Release, 16: 305-310.
- Ninhaus-Silveira, A., F. Foresti & A. Azevedo. 2006. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). Zygote, 14: 217-229.
- Ninhaus-Silveira, A., F. Foresti, A. Azevedo, C. A. Agostinho & R. Veríssimo-Silveira. 2009. Cryogenic preservation of embryos of

Prochilodus lineatus (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). *Zygote*, 17: 45-55.

Nowshari, M. A. & G. Brem. 2000. The protective action of polyvinyl alcohol during rapid-freezing of mouse embryos. *Theriogenology*, 53: 1157-1166.

Paradossi, G., F. Cavalieri & E. Chiessi. 2003. Poly (vinyl alcohol) as versatile biomaterial for potencial biomedical application. *Journal of Materials Science: Material in Medicine*, 14: 687-691.

Paula, D. A. J., E. S. Andrade, L. D. S. Murgas, V. O. Felizardo, E. U. Winkaler, W. Zeviani & R. T. F. Freitas. 2012. Vitamin E and reduced glutathione in *Prochilodus lineatus* (curimba) semen cryopreservation (Characiformes: Prochilodontidae). *Neotropical Ichthyology*, 10: 661-665.

Peng, Z. & F. Chen. 2010. Synthesis and Properties of Temperature-Sensitive Hydrogel Based on Hydroxyethyl Cellulose. *International Journal of Polymeric Materials* 59: 450–461.

Pugh, P. A., A. E. L. Ankersmit, L. T. McGowan & H.R. Tervit. 1998. Cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos: effects of protein

type and concentration during freezing or of liposomes during culture on post-thaw survival. *Theriogenology*, 50: 495-506.

Rodrigues-Galdino, A. M., C. V. Maiolino, M. Forgati, L. Donatti, J. D.

Mikos, P. C. F. Carneiro & F. S. Rios. 2009. Development of the neotropical catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae) incubated in different temperature regimes. *Zygote*, 18: 131-144.

Saka, Ş., K. Firat & D. İoban. 2004. Development of the common dentex (*Dentex dentex*) eggs in relation to temperature. *Aquaculture Research*, 35: 224-231.

SAS, 1999. Institute Inc. SAS/STAT Software Release 8.0. Cary, NC: SAS Institute Inc.

Shapiro, Y. E. & T. I. Shapiro. 1999. ¹H NMR Self-diffusion study of PVA cryogels containing ethylene glycol and its oligomers. *Journal of Colloid and Interface Science*, 217: 322-327.

Strecker, R., T. Seiler, H. Hollert & T. Braunbeck. 2011. Oxygen requirements of zebrafish (*Danio rerio*) embryos in embryo toxicity tests with environmental samples. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 153: 318-327.

Streit Júnior, D. P., M. Digmayer, R. P. Ribeiro, R. N. Sirol, G.V. Moraes & J. M. Galo. 2007. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42: 1199-1202.

Tabata, Y. & Y. Ikada. 1998. Protein release from gelatin matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31: 287-301.

Vajta, G., N. Rindom, T. T. Peura, P. Holm, T. Greve & H. Callesen. 1999. The effect of media, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after open pulled straw (ops) vitrification. *Theriogenology*, 52: 939-948.

Viveiros, A. T. M., L. H. Órfão, A. N. Maria & I. B. Allaman. 2009. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. *Animal Reproduction Science*, 112: 293-300.

Viveiros, A. T. M., Z. A. Isaú, H. C. P. Figueiredo, M. A. S. Leite & A. N. Maria. 2010. Gentamycin Controls Bacterial Growth during Refrigerated Storage of Piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, Semen. *Journal of The World Aquaculture Society*, 41: 57-65.

Vrana, N. E., K. Matsumura, S. Hyon, L. M. Geever, J. E. Kennedy, J. G. Lyons, C. L. Higginbotham, P. A. Cahill & G. B. McGuinness. 2011. Cell

encapsulation and cryostorage in pva-gelatin cryogels: Incorporation of carboxylated epsilon-poly-l-lysine as cryoprotectant. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 6: 280-290.

Wolfe, J. & G. Bryant. 2001. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. *International Journal of Refrigeration*, 24: 438-450.

Wowk, B., E. Leidl, C. M. Rasch, N. Mesbah-Karimi, S. B. Harris & G. M. Fahy. 2000. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology*, 40: 228-236.

Young S., M. Wong, Y. Tabata & A. G. Mikos. 2005. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *Journal of Controlled Release*, 109: 256-274.

Zhang, T., D. M. Rawson & J. G. Morris. 1993. Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachidanio rerio*). *Aquatic Living Resources*, 6: 145-53.

Zhang, Y. Z., S. C. Zhang, X. Z. Liu, Y. J. Xu, J. H. Hu, Y. Y. Xu, J. Li & S. L. Chen. 2005. Toxicity and protective efficiency of cryoprotectantes to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. *Therigenology*, 63: 763-773.

Tables

Table 1. Average temperature (°C), average oxygen (mg/L), average fertilization rate (%) and standard deviation in the experimental and funnel type incubators used in the experiment with curimba embryos (n=6). ^a Averages followed by different letters in the line differ by the Sckott Knott test (p<0.05).

Time (Hours)	Temperature (C) ^a		Oxygen (mg/L) ^a	
	Funnel type	Experimental	Funnel	Experimental
5:30	25.2±0.7a	22.6±2.6b	7.8±0.5a	7.1±0.1b
6:30	24.7±1.1a	23.3±2.1b	8.3±0.8a	7.5±0.2b
7:30	25.3±0.7a	21.7±3.2b	10.7±2.5a	8.8±1.1b
8:30	25.2±0.8a	23.3±2.1b	8.4±0.9a	7.3±0.1b
9:30	26.3±0.0a	24.7±1.1b	8.1±0.7a	7.3±0.1b
10:30	26.5±0.1a	25.5±0.6b	7.7±0.4a	6.2±0.6b
12:30	27.3±0.6a	25.8±0.4b	8.8±1.1a	6.2±0.6b
13:30	26.2±0.0a	26.0±0.2b	8.1±0.6a	6.7±0.2b
14:30	27.3±0.6a	26.4±0.1b	8.1±0.7a	6.2±0.6b
15:30	27.3±0.6a	26.6±0.1b	8.0±0.6a	6.4±0.5b
Fertilization rate (%) NS				
	Funnel type	Experimental		
	88.1±15.8	79.6±13.2		

Table 2. Average percentage (%) and standard deviation of viable larvae of curimba subjected to different cryoprotectants. ^{a,b} Averages followed by different capital letters in the line and small letters in the columns differ by the Krustal-Walis test ($p < 0.05$).

¹ Differs from control by the Krustal-Walis test ($p < 0.05$).

Solution	Dose	Internal Cryoprotectant	
		DMSO	Ethylene glycol
PVA	0.5%	34.4±29.0 Abc	8.4±18.4 Bbc
	1.0%	52.7±24.0 Aab	11.2±13.1 Babc
Gelatin	0.5%	54.4±37.9 Aab	16.1±25.2 Babc
	1.0%	40.4±26.4 b	39.2±31.8 a
Hydroxyethyl Cellulose	0.5%	46.3±38.9 b	25.4±29.5 ab
	1.0%	72.9 ¹ ±23.9 Aa	29.4±33.7 Bab
BSF	4%	16.1±19.3 c	13.2±32.4 abc
	8%	13.4±21.9 c	0.0 c
Control		83.3 ± 16.59	

Table 3. Average diameter chorio (CD) (μm) and standard deviation of embryos curimba subjected to different cryoprotectants and different time (during 60 min). DMSO: dimethylsulfoxide; ET: ethylene glycol; PVA: polyvinyl alcohol; GEL: gelatin; HIDR: hydroxyethylcellulose; BSF: fetal bovine serum; 8: 8%; 4: 4%. ^a*Differ from control by the Test Dunnett ($P < 0.05$).

Treatment	15 min	30 min	60 min
WATER	4031.30±37.01	2078.00±61.50	3555.30±101.10
DMSO PVA 1.0%	3057.30±37.44*	3022.66±58.50*	3039.00±63.37*
ET PVA 1.0%	3058.00±48.49*	3346.00±21.00*	3134.70±10.06*
DMSO PVA 0.5%	3306.00±96.06*	1651.66±29.02*	3117.70±21.59*
ET PVA 0.5%	4118,70±72,14	2295,33±72,14*	4094,70±39,20*
DMSO GEL 1.0%	3913.30±48,08	2363.66±59.24*	3963.70±85.00*
ET GEL 1.0%	3590.70±42.50*	2137.33±24.68	3510.30±44.41
DMSO GEL 0.5%	4020.70±101.00	2127.33±72.23	3623.00±45.39*
ET GEL 0.5%	4041.30±69.00	2095.33±156.01	3775.00±110.72*
DMSO HID 1.0%	4107.30±48.05	2206.66±69.06*	3766.00±101.37*
ET HID 1.0%	3708.30±95.51*	2271.33±48.34*	3684.30±17.95*
DMSO HID 0.5%	3934.70±53.37	2229.33±8.32*	3751.30±51.01*
ET HID 0.5%	3809.00±164.50*	2375.33±164.50*	4074.70±13.79*
DMSO BSF 8%	3568.00±265.51*	1947.33±67.68*	3523.00±49.66
ET BSF 8%	3621.70±95.51*	1927.33±60.04*	3413.70±153.95*
DMSO BSF 4%	3712.00±16.09*	2066.33±21.03	3406.30±160.12*
ET BSF 4%	3724.00±47.50*	1953.33±13.31*	3400.00±54.36*
CV (%)	2,76	2,70	2,23

Table 4. Average diameter embryo (ED) (μm) and standard deviation of embryos curimba subjected to different cryoprotectants and different time (during 60 min). DMSO: dimethylsulfoxide; ET: ethylene glycol; PVA: polyvinyl alcohol; GEL: gelatin; HIDR: hydroxyethylcellulose; BSF: fetal bovine serum. ^a*Differ from control by the Test Dunnett ($P < 0.05$).

Treatment	15 min	30 min	60 min
WATER	1186.00 \pm 37.98	694.33 \pm 7.93	1381.70 \pm 29.02
DMSO PVA 1.0%	1218.00 \pm 22.60	1163.00 \pm 35.11*	1348.70 \pm 31.34
ET PVA 1.0%	1215.00 \pm 29.73	1153.33 \pm 15.30*	1308.30 \pm 25.50
DMSO PVA 0.5%	1176.70 \pm 5.56	669.66 \pm 11.50	1230.30 \pm 76.03*
ET PVA 0.5%	1284.00 \pm 37,87*	724.66 \pm 5.50	1197.30 \pm 68.79*
DMSO GEL 1.0%	1329.30 \pm 18.08*	759.66 \pm 28.51*	1232.70 \pm 32.41*
ET GEL 1.0%	1194.00 \pm 25.57	692.00 \pm 61.58	1156.00 \pm 100.80*
DMSO GEL 0.5%	1267.70 \pm 11.59*	693.67 \pm 29.02	1365.30 \pm 174.13
ET GEL 0.5%	1285.70 \pm 51.59*	701.66 \pm 34.00	1361.00 \pm 97.68
DMSO HID 1.0%	1248.70 \pm 9.86*	709.33 \pm 61.13	1320.00 \pm 5.68
ET HID 1.0%	1238.70 \pm 7.76*	685.33 \pm 36.29	1047.30 \pm 35.57*
DMSO HID 0.5%	1283.70 \pm 22.74*	819.33 \pm 3.51*	1311.70 \pm 53.50
ET HID 0.5%	1169.70 \pm 37.00	698.33 \pm 44.50	1201.00 \pm 158.52*
DMSO BSF 8%	1242.00 \pm 67.06*	673.00 \pm 52.31	1263.00 \pm 59.13*
ET BSF 8%	1253.70 \pm 15.37*	653.33 \pm 9.07	1524.70 \pm 65.04*
DMSO BSF 4%	1244.30 \pm 66.02*	669.66 \pm 18.02	1252.70 \pm 77.13*
ET BSF 4%	1172.00 \pm 38.43	674.00 \pm 23.45	1175.30 \pm 63.51*
CV (%)	2.93	4.40	6.34

Figure legends**Fig. 1.** Representative image of the experimental incubators

(VERSÃO PRELIMINAR)

**ARTIGO 2 Embriões de zebrafish (*Danio rerio*) resfriados com
hidroxietilcelulose e sacarose associadas ao dimetilsulfóxido**

Daniella Aparecida de Jesus Paula^{*}
Luis David Solis Murgas¹
Mônica Rodrigues Ferreira Machado²
Silvia E. Arranz³
Rafael Vilhena Reis Neto⁴
Denílson Rabelo⁵
Viviane de Oliveira Felizardo¹

**Artigo formatado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003),
conforme exigido pela UFPA.**

^{*} Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, Lavras-MG, 37200000. E-mail: daniufla2002@yahoo.com.br.

¹ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, Lavras-MG, 37200000

² Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia-GO, 74605010.

³ Faculdade de Ciências Bioquímicas e Farmacêuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario-AR, 2000

⁴ Universidade Estadual Paulista, Campus Experimental de Registro, Registro-SP, 11.900-000

⁵ Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, IQII, 74001970, Goiânia-GO

RESUMO

Diferentes soluções crioprotetoras e tempos de exposição foram avaliados quanto a sua toxicidade e seus efeitos no resfriamento de embriões de *Danio rerio*. No teste de toxicidade, os embriões foram submetidos às soluções R0: Meio E3; R1: Hidroxietilcelulose (HEC) $1,15 \times 10^{-5} \text{M}$ e Dimetilsulfóxido (DMSO) 1.28M; R2: Meio E3 $1,15 \times 10^{-5} \text{M}$ e DMSO 1.28M; R3: Sacarose (SAC) 0.5M e DMSO 1.28M; R4: Meio E3 0.5M e DMSO 1.28M por 1 a 5h de exposição (28°C) e avaliada a eclosão das larvas. No resfriamento, os embriões foram levados a 0°C por 1 a 5 horas com as soluções: C1: HEC $1,15 \times 10^{-5} \text{M}$ e DMSO 1.28M; C2: Controle negativo: meio E3; C3: SAC 0.5M e DMSO 1.28M. C0 contendo embriões em Meio E3, foi mantido a 28°C . Após a exposição, os embriões foram levados a 28°C para eclosão e então avaliadas as larvas (normais e anormais). Embriões (n=5) foram retirados e capturadas imagens para avaliar: área total do embrião (AT), diâmetro médio do cório (DC) e diâmetro médio do embrião (DE). Os dados foram submetidos à análise de variância, posteriormente à análise regressão para as porcentagens de eclosão em função dos tempos de exposição em cada solução e as variáveis morfométricas avaliadas pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) utilizando-se o pacote computacional R. A porcentagem média de eclosão diminuiu com os tempos de exposição para R2, R3, R4, C1, C2 e C3 ($P < 0,05$). A porcentagem média de larvas anormais aumentou com os tempos de exposição para C2 e aumentaram até 3h de exposição, caíram às 4 e 5h (0%) para C3 e C4 ($P < 0,05$). Foram observados edema do pericárdio, edema do saco vitelínico e má formação axial em todos os tratamentos. AT e DC foram maiores para C1 e C3 e aumentaram de 1h de exposição para 2h, diminuíram às 3h, e aumentaram às 4h ($P < 0,05$). Houve interação entre os tratamentos para DE e observou-se que para C1 as médias diminuíram de 1h para 2h de exposição e mantiveram-se até 5h e para C3 as médias diminuíram de 1h para 2h de exposição, aumentaram às 3h e 4h e diminuíram às 5h ($P < 0,05$). Concluímos que a HEC e a SAC combinadas ao DMSO podem ser utilizadas durante 2h de resfriamento a 0°C mantendo a porcentagem de eclosão média de 60% e as principais más formações encontradas para todos os tratamentos foram edema do pericárdio, edema do saco vitelínico e má formação axial.

Palavras-chave: Conservação. Crioprotetores. Peixes. Reprodução.

1 INTRODUÇÃO

O congelamento de embriões é uma biotecnologia importante a ser utilizada em programas de melhoramento e conservação de recursos genéticos, pois permite a formação de bancos de estocagem de embriões, com interface em programas de conservação *in* e *ex situ*, manutenção da integridade e heterozigose. Essa prática representa um potencial para proteção e manejo de espécies ameaçadas (ANDRABI; MAXWELL, 2007; WOELDERS; ZUIDBERG; HIEMSTRA, 2006) e pode contribuir com avanços na criopreservação de embriões.

Entretanto, enquanto o protocolo de criopreservação não é desenvolvido para as espécies de peixes, o resfriamento surge como uma opção emergente para facilitar a troca de material genético e o transporte de embriões. Estudos utilizando protocolos de congelamento/resfriamento de embriões de peixes foram descritos para *Ciprinus carpio* por Ahammad, Bhattachayya e Jana (2002, 2003) e Dinnyés et al. (1998) e para *Piaractus mesopotamicus* por Fornari et al. (2011) e Streit et al. (2007).

Para se desenvolver um protocolo eficaz de resfriamento/congelamento é necessário observar as propriedades osmóticas das células. Se o resfriamento for rápido, o potencial químico da água e da solução extracelular diminui mais rápido do que o da água intracelular, resultando em água intracelular remanescente que, eventualmente, forma gelo na célula e que muitas vezes é letal (ZHANG; LIU; RAWSON, 2003). Em estudos com embriões de zebrafish (*Danio rerio*) foi observado o efeito das curvas de resfriamento lento

(10°C/minuto), intermediário (30°C/minuto) e rápido (~300°C/minuto), utilizando-se o metanol como crioprotetor e em diferentes estádios embrionários, recomendando-se o resfriamento lento (ZHANG; RAWSON, 1996).

O zebrafish é um dos peixes tropicais de água doce mais utilizado e reconhecido pelos pesquisadores devido às suas inúmeras vantagens como modelo experimental. As aplicações dessa espécie vão desde sua utilização em estudos com toxicologia (ROCHA et al., 2011) até modelo para pesquisas com doenças humanas (NEWMAN et al., 2011). As principais características do zebrafish incluem a alta fecundidade, o pequeno tamanho, o curto intervalo de geração e a transparência durante a embriogênese, que influenciam diretamente na escolha desse animal e o faz surgir como um modelo de vertebrados preeminente na pesquisa biomédica (LAWRENCE, 2007).

Um dos maiores problemas relatados no processo de congelamento está relacionado com o tamanho do embrião de peixes, que é maior que a maioria dos embriões de mamíferos e exibem parâmetros criobiológicos diferentes. Além disso, a semipermeabilidade do córion, diminui a capacidade de penetração do crioprotetor, determinando uma barreira importante para penetração do crioprotetor e conseqüentemente a remoção osmótica da água durante o processo de resfriamento, explicando a baixa efetividade da utilização das técnicas tradicionais (HAGEDORN et al., 2004).

Os crioprotetores são substâncias químicas que protegem as células contra as injúrias causadas pelo resfriamento e descongelamento (SQUIRES et al., 1999) e são considerados essenciais a esses processos.

Além disso, a combinação de crioprotetores intracelulares e extracelulares confere uma maior proteção do que seu uso isolado (DALIMATA; GRAHAM, 1997).

Lahnsteiner (2008) observou que o DMSO (Dimetilsulfóxido) foi o crioprotetor menos tóxico para embriões de zebrafish, quando comparado ao 1,2-propanodiol, etilenoglicol, glicerol, metanol, dimetilacetamida e observaram também que a sacarose e a glicose como crioprotetores externos foram menos tóxicas que os crioprotetores internos. A sacarose é um crioprotetor externo amplamente utilizado nos processos de resfriamento/congelamento de embriões de peixes (FORNARI et al., 2011; LOPES et al., 2011; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2009; RAHMAN et al., 2011; STREIT et al., 2007; ZHANG et al., 2007). Entretanto, espera-se que novas substâncias sejam testadas para que o congelamento torne-se uma técnica de rotina e com excelentes resultados.

A hidroxietilcelulose é um componente estrutural das plantas conferindo-lhes rigidez e que, em diferentes concentrações, formam géis com diferentes viscosidades que poderiam beneficiar os embriões no processo de resfriamento. Esse gel possibilita inúmeras aplicações bioquímicas/farmacêuticas e na bioengenharia como, por exemplo, liberação controlada de fármacos (KAJJARI; MANJESHWAR; AMINABHAVI, 2011), material para a construção de biossensores (ALBAREDA-SIRVENT; ARBEN; SALVADOR, 2000) e aplicações na engenharia de tecidos (ZULKIFLI et al., 2013). Devido a essas propriedades, somadas às características de não toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade da hidroxietilcelulose (PENG;

CHEN, 2010), acredita-se ainda que essa substância possa agir como crioprotetor extracelular.

O resfriamento/congelamento permite diversas práticas na criação de peixes como, por exemplo, transporte de embriões, sincronização de fases de desenvolvimento, troca de animais e também permite obter resultados que ajudam a compreender o processo de criopreservação. Dessa forma, novas substâncias devem ser testadas (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2009) a fim de buscar respostas para se alcançar o sonhado sucesso na criopreservação de embriões. Objetivou-se, neste trabalho, testar diferentes soluções crioprotetoras e tempos de exposição, avaliando seus efeitos na toxicidade e no resfriamento de embriões de zebrafish.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Embriões

Os experimentos foram realizados no laboratório do Instituto de Biología Molecular de Rosário do Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas da Universidad Nacional de Rosário, Rosário-Argentina.

Os embriões foram coletados semanalmente, durante 21 dias, sendo os animais selecionados de acordo com o plantel disponível para o dia da semana.

Os animais (*D. rerio*) foram separados no dia anterior a cada reprodução, em pequenas gaiolas (11 cm de largura, 10 cm de altura 18 cm de comprimento) contendo 5 fêmeas (total de 3 gaiolas) e uma gaiola maior (15 cm de largura x 10 cm de altura x 20 cm de comprimento),

contendo 9 machos. As gaiolas foram mantidas em aquários de 40 L com sistema de recirculação e oxigenação constante e temperatura controlada a 28°C. No dia seguinte, pela manhã, os machos foram acondicionados na gaiola das fêmeas (3 machos/5 fêmeas) e reduzida em 70% a quantidade de água no aquário para aumentar o contato entre os peixes, onde foram mantidos por 30 minutos. Após os 30 minutos, os embriões foram coletados por um sifão e mantidos no meio E3, em placas de petri (aproximadamente 100 embriões por placa), em estufa Marne[®] (28°C) até a fase de 50% de epibolia.

O meio E3 é um meio que permite a padronização do desenvolvimento embrionário de zebrafish (DI PRINZIO et al., 2010; HAFFTER et al., 1996) e é constituído por 5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄, e 0.1% de azul de metileno.

Para avaliação da fase dos embriões, as placas de petri foram levadas de hora em hora, da estufa para o estereomicroscópio (Olympus SZX-12) e observada a fase em que os embriões se encontravam, levando-se em consideração que a fase de 50% de epibolia ocorre, aproximadamente, 5 horas pós-fertilização para zebrafish mantidos a 28,5°C (17).

2.2 Teste de toxicidade

Um teste de toxicidade foi conduzido para avaliar o efeito das soluções sobre os embriões, em temperatura de 28°C. Os embriões foram acondicionados em placas de 24 poços (n=20 embriões por poço), com soluções contendo os seguintes tratamentos por 5 tempos de exposição (1, 2, 3, 4 e 5 horas):

R0-Controle positivo: meio E3 para desenvolvimento dos embriões;

R1-Hidroxietilcelulose (HEC) 1,5% ($1,15 \times 10^{-5} \text{M}$) e Dimetilsulfóxido (DMSO) 10% (1.28 M);

R2- Meio E3 ($1,15 \times 10^{-5} \text{M}$) e 10% DMSO (1.28 M);

R3- Sacarose (SAC) 17% (0.5 M) e DMSO (1.28 M);

R4- Meio E3 (0.5 M) e 10% DMSO (1.28 M).

Os tratamentos R2 e R4 foram adicionados ao experimento para observarmos os efeitos do DMSO isoladamente. Para isso, o meio E3 (considerado como controle) foi ajustado para conter a mesma molaridade dos tratamentos R1 e R3 e adicionado 10% de DMSO. A hidroxietilcelulose utilizada no experimento foi da Polytechno Indústrias Químicas Ltda, a sacarose e os constituintes do meio E3 utilizados foram da SIGMA[®] e o DMSO da EMSURE[®].

Ocorrido cada tempo de exposição aos tratamentos, as placas foram retiradas da estufa para remoção das soluções e os embriões foram lavados com meio E3 e adicionado um meio E3 novo, em cada poço e então levadas novamente à estufa para continuarem seu desenvolvimento até a eclosão. Foi avaliada a porcentagem de eclosão das larvas nos diferentes tratamentos e em tempos de exposição. Para os cálculos foi considerado o número de larvas eclodidas em relação ao total de larvas (%). No experimento foram realizadas 3 repetições (20 embriões x 5 soluções x 5 tempos x 3 poços = Total de 1500 embriões por vez).

2.3 Resfriamento

Para o experimento de resfriamento os embriões (n=20 embriões por poço) foram acondicionados em placas de 24 poços, contendo as seguintes soluções:

C0-Controle positivo: meio E3 (embriões foram mantidos a 28°C);

C1-HEC ($1,15 \times 10^{-5}$ M) e DMSO 10% (1.28 M);

C2-Controle negativo: meio E3.

C3-SAC (0.5 M) e DMSO 10% (1.28 M);

Após a exposição aos crioprotetores, os embriões submetidos aos tratamentos C1, C2 e C3 foram levados à câmara fria (0°C) por 1, 2, 3, 4 e 5 horas de resfriamento (taxa de resfriamento de $0,2^\circ\text{C min}^{-1}$). O experimento foi realizado 3 vezes no tempo (20 embriões x 4 soluções x 5 tempos x 3 poços = Total de 1200 embriões por vez).

Posteriormente a cada tempo de resfriamento, as placas foram retiradas da câmara fria e as soluções também foram removidas, os embriões lavados com meio E3, adicionado um novo meio E3 e então os embriões foram levados até a estufa e mantidos em temperatura (28°C) até a eclosão das larvas. Foram avaliadas: porcentagem de eclosão, porcentagem de larvas normais, porcentagem de larvas anormais e porcentagem de ovos gorados. Foram consideradas como normais: as larvas que apresentaram morfologia íntegra dos órgãos e tecidos comum à espécie; anormais: as larvas que não apresentavam morfologia íntegra dos tecidos e órgãos; e os ovos gorados: aqueles embriões que não se desenvolveram e apresentavam opacidade. Para os cálculos das larvas normais, anormais e ovos gorados, foram considerados o valor de cada grupo de larvas em relação ao total de larvas em porcentagem.

Foi retirada uma amostra de 5 embriões e capturadas imagens para avaliar a morfologia. As imagens foram adquiridas logo após os embriões passarem pelos diferentes tratamentos e diferentes tempos de exposição e antes de serem retiradas as soluções de tratamento e adicionado o meio E3 para os embriões continuarem seu desenvolvimento embrionário à temperatura de 28°C.

Após a captura, as imagens foram avaliadas no programa IMAGE J, para análise da influência dos crioprotetores/resfriamento na morfologia do embrião. Foram consideradas as medidas da área total do embrião (AT), do diâmetro médio do cório (DC) e o diâmetro médio do embrião propriamente dito (DE) em μm (Figura 1). Somente os embriões intactos foram considerados.

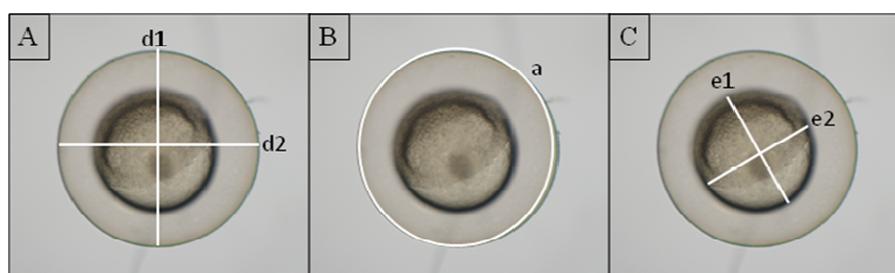


Figura 1 - Análise morfométrica de embriões de zebrafish durante o resfriamento com Hidroxietilcelulose, Sacarose e Dimetilsulfóxido a 0°C pelo IMAGE J

Nota: (A) d1, d2: diâmetro do cório; diâmetro médio do cório = $(d1+d2/2)$; (B) a: área do embrião; (C) e1, e2: diâmetro do embrião; diâmetro médio do embrião = $(e1+e2/2)$.

2.4 Análise estatística

Foi adotado o delineamento experimental em blocos casualizados (DBC), com repetição nos tratamentos, sendo 3 blocos com 3 repetições

por bloco. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 5x5 (5 soluções + 5 tempos de exposição), para o teste de toxicidade e 4x5 (4 soluções + 5 tempos de exposição), para o resfriamento. O controle local, para extrair o efeito dos animais (blocos) do resíduo, foi aplicado para as semanas. Os dados em todas as análises foram testados quanto à normalidade, independência dos resíduos e homocedasticidade de variâncias e submetidos à análise de variância ($\alpha=0,05$), considerando um esquema fatorial de tratamento, utilizando-se o pacote computacional R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013).

Posteriormente, para o teste de toxicidade foi realizada uma análise de regressão para a variável taxa de eclosão, em função dos tempos de exposição para cada solução.

Para o experimento de resfriamento foi realizada análise de regressão para as variáveis: porcentagem de eclosão, porcentagem de larvas anormais, porcentagem de ovos gorados e diâmetro médio do embrião, em função dos tempos de exposição para cada solução de tratamento. Para as variáveis área total e diâmetro médio do cório não houve interação. Entretanto houve diferença significativa entre os tratamentos, porém sem efeito linear ou quadrático e, então, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS

3.1 Teste de toxicidade

Houve interação entre os tratamentos e observou-se diminuição da porcentagem de eclosão, conforme aumentou-se o tempo de exposição ($p<0.05$), para os tratamentos R2, R3 e R4. Para o tratamento R1 houve

diferença significativa ($p < 0.05$) e observou-se que a porcentagem de eclosão cai até as 3 horas, aumentando novamente as 4 horas de exposição e voltando a cair as 5 horas, sendo que todas as médias são consideradas altas e satisfatórias, para todos os períodos de exposição (Figura 2).

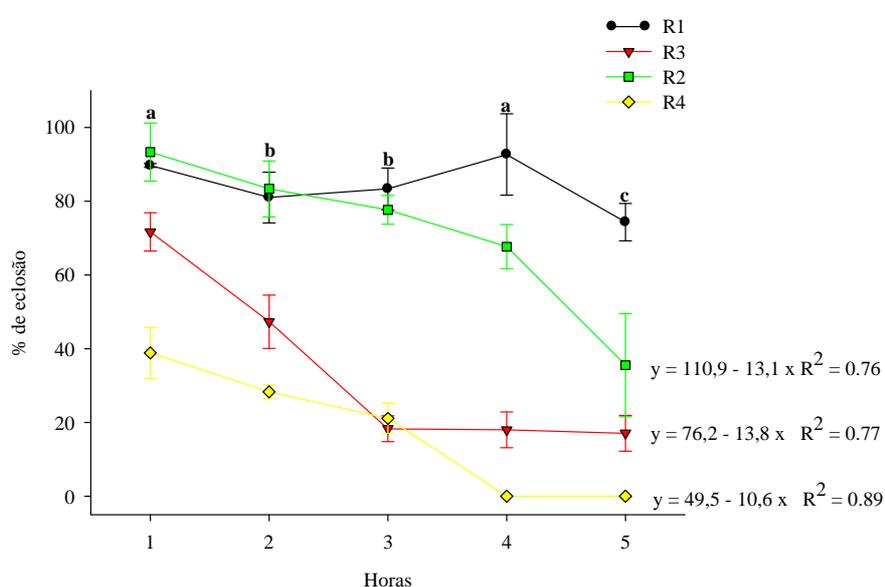


Figura 2 - Porcentagem média de eclosão de larvas de *D. rerio* submetidas ao teste de toxicidade a 28°C com hidroxietilcelulose (HEC), Sacarose (SAC) e Meio E3 e associados ao dimetilsulfóxido (DMSO)
Nota: Médias seguidas por diferentes letras são significativamente diferentes (Scott-Knott; $p < 0.05$).

3.2 Resfriamento

Houve interação entre as soluções e o tempo de exposição para o ensaio de resfriamento e observa-se que a porcentagem média de eclosão

diminui ($P < 0.05$) para os tratamentos C1, C2 e C3 conforme aumentam-se os tempos de exposição aos tratamentos (Figura 3).

A porcentagem de larvas anormais apresenta efeito linear crescente ($P < 0.05$) para o tratamento C2, ao longo dos tempos de exposição e um efeito quadrático para os tratamentos C1 e C3, sendo que as médias aumentam até as 3 horas de exposição caindo bruscamente as 4 e 5 horas seguintes de exposição (0%) (Figura 4).

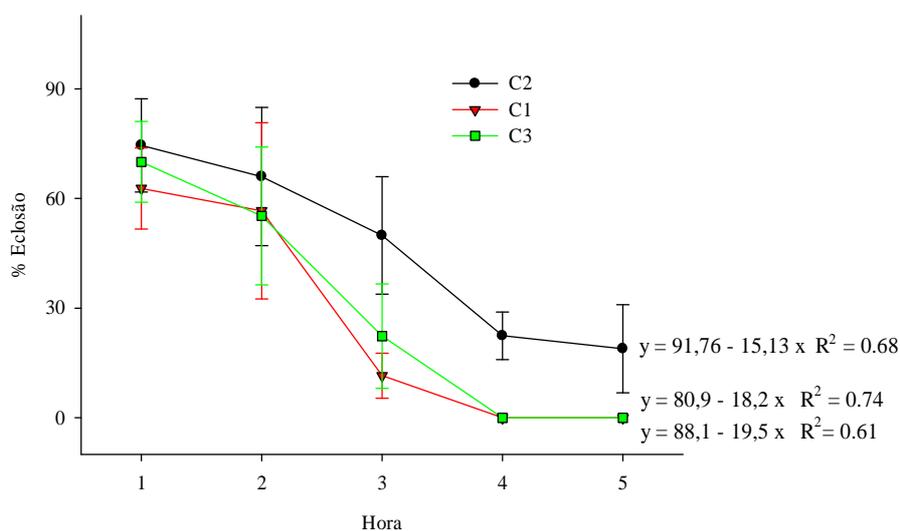


Figura 3 - Porcentagem média de eclosão de larvas de *D. rerio* submetidas ao resfriamento (0°C), sem crioprotetores e com Hidroxietilcelulose e Sacarose associada ao dimetilsulfóxido (DMSO)

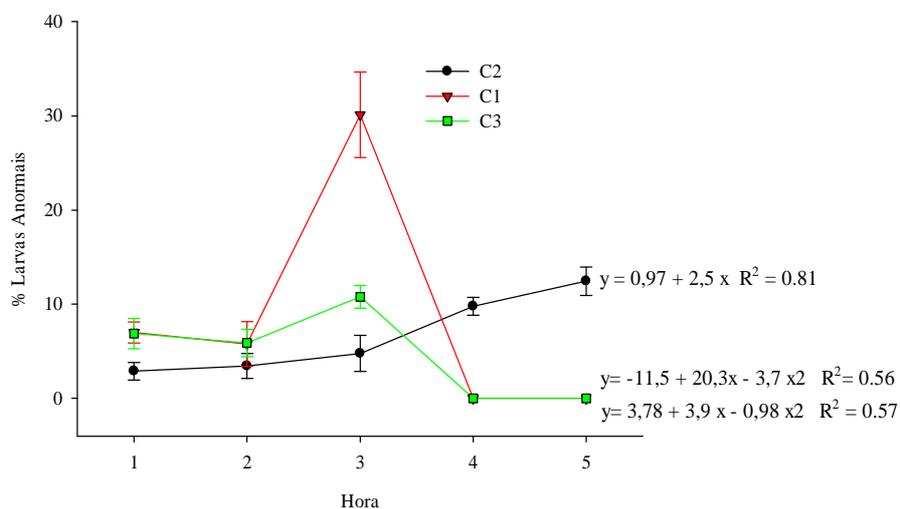


Figura 4 - Porcentagem média de larvas com má formações de *D. rerio* submetidas ao resfriamento (0°C), sem crioprotetores (Controle negativo) e com Hidroxietilcelulose e Sacarose associadas ao dimetilsulfóxido (DMSO)

Foram observadas as seguintes más formações: edema do pericárdio (EP), edema do saco vitelínico (ESV) e má formação axial (MFA), em todos os tratamentos. Na figura, percebe-se que os embriões expostos a todos os tratamentos, e em diferentes horários, apresentaram as mesmas deformidades incluindo o controle, em menor proporção (Figura 5).

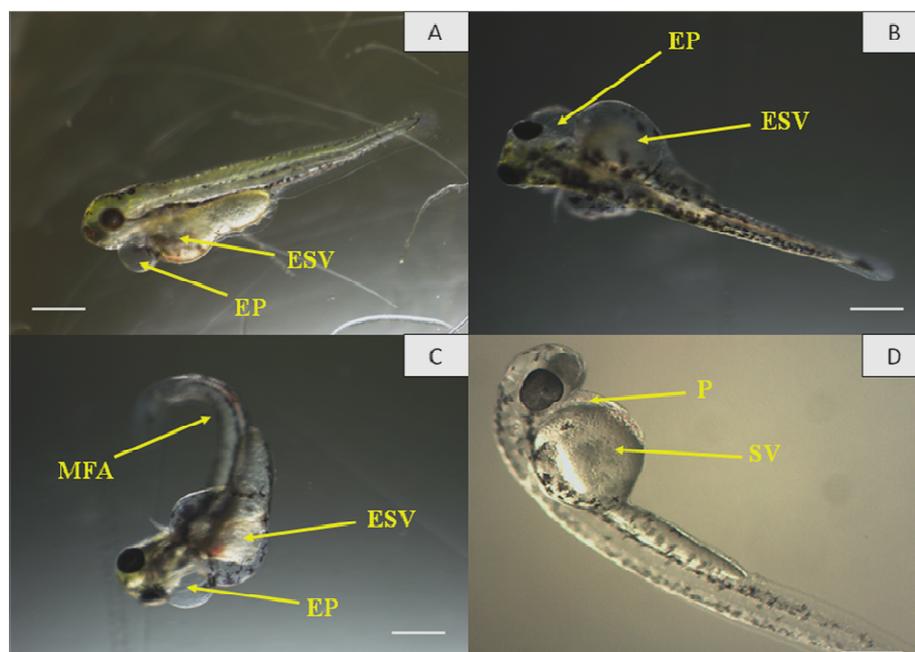


Figura 5 - Imagens de microscopia de larvas de zebrafish, durante o resfriamento a 0°C com HEC, SAC e DMSO

Nota: (A,B) Grupo exposto a HEC e DMSO por 4 horas; (C) Grupo exposto a SAC com DMSO por 5 horas; (D) Controle. MFA, má formação axial; P, pericárdio; EP, edema do pericárdio; SV, saco vitelínico; ESV, edema do saco vitelínico. Barra de escala = 0.16mm.

Avaliando-se os diferentes tempos de exposição, pode-se observar que a área total e o diâmetro médio do cório foram diferentes ao longo do tempo, aumentando na primeira hora de exposição, voltando a diminuir as 3h e aumentando novamente as 4h, mantendo-se em seguida as 5h ($P < 0.05$) (Tabela 3).

Houve interação para os tratamentos C2 e C3 nos diferentes tempos de exposição para o diâmetro médio do embrião, podendo-se observar uma diminuição do diâmetro médio do embrião de 1h para 2 horas de exposição, mantendo-se para o tratamento C2, durante os

posteriores tempos de exposição (3, 4 e 5 horas) e aumentando para o tratamento C3, as 3h e 4 horas e diminuindo novamente as 5h ($P<0.05$) (Tabela 3).

Tabela 1 - Área total (AT), diâmetro médio do cório (CD) e diâmetro médio do embrião (ED) em μm dos embriões de *D. rerio* submetidos ao r (0°C), sem crioprotetores e com Hidroxietilcelulose e Sacarose associadas ao Dimetilsulfóxido (DMSO)

V	Hora	Solução				Média ¹
		C0	C2	C1	C3	
AT	1	1,04	0,95	1,14	1,31	1,06±0,10B
	2	1,10	1,15	1,17	1,14	1,14±0,08A
	3	1,08	1,05	1,09	1,17	1,10±0,07B
	4	1,10	1,09	1,16	1,12	1,16±0,09A
	5	1,08	1,03	1,16	1,21	1,12±0,10A
Média¹		1,08±0,06B	1,05±0,09B	1,14±0,07A	1,18±0,09A	
DC	1	1,14	1,20	1,214	1,20	1,19±0,11B
	2	1,19	1,21	1,214	1,20	1,20±0,03A
	3	1,15	1,15	1,179	1,23	1,17±0,04B
	4	1,18	1,20	1,206	1,26	1,21±0,05A
	5	1,15	1,24	1,207	1,24	1,21±0,12A
Média¹		1,11±0,05B	1,17±0,14B	1,20±0,04A	1,23±0,04A	
DE ¹	1	0,70	0,69	0,72A	0,68A	0,69±0,03
	2	0,73	0,73	0,66B	0,61B	0,68±0,07
	3	0,74	0,72	0,64B	0,68A	0,69±0,04
	4	0,73	0,72	0,66B	0,71A	0,71±0,03
	5	0,74	0,73	0,63B	0,57B	0,67±0,05
Média		0,72±0,03	0,73±0,03	0,66±0,21	0,65±0,06	

Nota: O controle positivo corresponde aos embriões que se desenvolveram a 28°C e sem crioprotetores.

¹Médias seguidas por diferentes letras nas colunas e nas linhas são significativamente diferentes entre si (Scott-Knott; $P<0.05$).

CP: controle positivo; CN: controle negativo; HEC: hidroxietilcelulose; SAC: sacarose.

4 DISCUSSÃO

A HEC não é comumente utilizada como crioprotetor, mas é empregada como matriz para muitos testes bioquímicos e farmacêuticos. Neste trabalho, a HEC apresentou seu efeito benéfico quando avaliada juntamente com o DMSO e quando comparada à SAC, associada ao DMSO no teste de toxicidade. As porcentagens médias de eclosão, apresentadas pela associação da HEC com DMSO na temperatura de 28°C foram altas, ao longo das 5 horas de exposição. Esses resultados, que podem ser explicados pelas características de não toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade da HEC (PENG; CHEN, 2010) e que justificariam sua utilização, durante o processo de resfriamento.

A SAC associada DMSO apresentou baixas taxas de eclosão que diminuem linearmente ao longo das 5 horas de exposição, no teste de toxicidade, sendo que Rahman et al. (2011) também observaram uma redução na taxa de eclosão em tempos curtos de 2 minutos para 4 e 6 minutos a 24 °C em embriões de Japanese whiting (*Sillago japonica*), nos estágios de somitos e alongação da cauda, expostos a 1 M de sacarose ou trealose em água do mar artificial.

Fornari et al. (2012) observaram taxa de eclosão de 64,0±3,4%, após 12 horas de armazenamento a -8°C, utilizando 9% de metanol e 17,1% de sacarose para embriões de *Piaractus mesopotamicus*. Os meios associados ao DMSO (R2 e R4) demonstraram o efeito desse crioprotetor, em que foram observadas menores taxas de eclosão e que diminuem ao longo das 5 horas de exposição e continham apenas o DMSO no teste de toxicidade. Entretanto, não devemos concluir os resultados com base apenas no teste de toxicidade ou apenas no resfriamento, pois o efeito

crioprotetor das soluções foi maior e positivo no experimento de resfriamento, em que as médias são maiores nas duas primeiras horas de resfriamento, quando comparadas ao teste de toxicidade.

Lahnsteiner (2008) também avaliaram os efeitos de crioprotetores internos e externos em embriões de *D. rerio*, durante 48 horas e observaram um efeito menos tóxico do DMSO comparado a outros crioprotetores (1,2-propanodiol, glicerol, etilenoglicol, metano e dimetilacetamida), sendo que os crioprotetores externos sacarose e glicose foram menos tóxicos, quando avaliados isoladamente. Esses autores também observaram que os estágios ontogenéticos iniciais foram os que apresentaram maior sensibilidade aos crioprotetores, quando comparados a estágios avançados. Entretanto, o resfriamento e congelamento tardiamente podem não ser indicados, pois os animais já estariam perto da eclosão e não justificaria congelá-los próximo a formação completa.

Streit et al. (2007) observaram que, para embriões de *Piaractus mesopotamicus* a fase de fechamento de blastóporo foi adequada para sobrevivência de 69,2% dos embriões resfriados a -8°C com 17,1% sacarose e 9% metanol. Neste trabalho, utilizou-se a fase de 50% de epibolia (aproximadamente 6 horas) que se encontra anterior à fase de fechamento de blastóporo para *D. rerio* (aproximadamente 9 horas), que pode ter sido mais sensível aos efeitos da HEC, SAC combinadas ao DMSO. De acordo com Lahnsteiner (2008), uma das razões pela qual os estágios ontogenéticos iniciais são mais sensíveis ao congelamento pode ser pelo baixo potencial desintoxicante ou vias regulatórias metabólicas subdesenvolvidas nessa fase e que poderia ser incapaz de compensar o efeito tóxico dos crioprotetores.

Durante o resfriamento, as taxas de eclosão caíram linearmente, tanto para a HEC (C1), quanto para a SAC (C3). Um dos fatores que poderia explicar esse fato, é que os tratamentos não foram capazes de controlar a formação de gelo intracelular e os embriões foram mais sensíveis ao frio e aos tratamentos, confirmados também pela maior taxa de larvas anormais para a C3.

Fornari et al. (2011) concluíram que 0.25, 0.50, 0.75 e 1M de sacarose combinada a 9,0% de metanol não evitou a formação de cristais de gelo, durante o congelamento e o descongelamento de embriões de *Piaractus mesopotamicus*, porém, o nível de lesões observadas foi reduzido nos embriões tratados com 17,0% (0.5 M) de sacarose acrescido de 9,0% de metanol, o que seria, segundo os autores, um argumento convincente para novos estudos. Entretanto, para embriões de *D. rerio*, nas condições em que foram realizados os experimentos, nenhum tratamento foi capaz de proteger os embriões, durante o resfriamento a 0°C a partir de 2 horas de tratamento, em que a porcentagem de eclosão cai bruscamente e a porcentagem de larvas anormais aumenta, ao longo dos períodos de exposição.

A porcentagem de larvas anormais foi baixa e foram observadas em todos os tratamentos, incluindo os edemas no tratamento controle. Provavelmente, a principal causa das deformidades encontradas nos tratamentos é devido à presença do DMSO, um crioprotetor importante e essencial ao congelamento (LAHNSTEINER, 2008) que, entretanto apresenta certa toxicidade principalmente em concentrações maiores como a utilizada neste trabalho. Alguns estudos avaliaram o efeito do DMSO em concentrações de 0,1 e 1% sobre as larvas de zebrafish e

também observaram edemas do saco vitelínico e corpo tortuoso (CHEN; WANG; WU, 2011).

Hallare et al. (2006) observaram defeitos na nadadeira, baixa pigmentação, redução no batimento cardíaco, edema e corpo torto em larvas de zebrafish submetidos 1, 1,5 e 2% de DMSO e demonstraram que o DMSO é o indutor mais potente de proteínas de stress.

Estudos com roedores concluíram que a administração intraperitoneal de DMSO pode levar a efeitos neurotóxicos no sistema nervoso periférico como, por exemplo, redução na velocidade de condução do nervo e na concentração de 7,2% o que levou à alterações estruturais no nervo ciático com disfunção da mielina e lamela de mielina não compactada (CAVALETTI et al., 2000). Além disso, o teste de toxicidade comprova que o DMSO isoladamente foi tóxico, quando observamos as médias inferiores para esse tratamento, ao longo dos tempos de exposição.

A morfologia está diretamente relacionada com o volume do embrião e observamos esse padrão nos resultados. Provavelmente, a sacarose e a hidroxietilcelulose combinadas ao DMSO apresentaram algum efeito crioprotetor para os embriões de zebrafish, auxiliando a osmorregulação do embrião, durante as 2 horas de exposição e resfriamento, que, entretanto não foi suficiente ao longo das 5 horas para evitar a formação de gelo intracelular e, provavelmente, os embriões não puderam compensar o efeito tóxico principalmente do DMSO.

Alguns autores utilizaram a análise morfométrica como parâmetro para avaliar a permeabilidade de embriões aos crioprotetores, sendo que Lahnsteiner (2008) encontraram resultados semelhantes para a mesma

espécie, utilizando diversos crioprotetores. Isso incluiu a sacarose e o DMSO à temperatura de 27°C, com alguns minutos de exposição.

Lopes et al. (2011) observaram que, para *P. mesopotamicus*, o diâmetro do cório em diferentes estágios de desenvolvimento (1.4, 5.2, 8 e 13.3 hpf) e por 6 e 10 horas de resfriamento não diferiram do controle. Esses mesmos autores observaram diâmetro menor do embrião, quando selecionados em 8hpf e com 6h de congelamento e também diferiram do controle e dos embriões congelados por 10 h. Entretanto, o diâmetro dos embriões foi maior em 1,4 hpf, com 10h de congelamento e o diâmetro dos embriões congelados diferiu do controle, concluindo que a ação do crioprotetor está diretamente relacionada ao estágio de desenvolvimento e ao tempo de congelamento.

É difícil comparar resultados de morfologia entre os diferentes trabalhos, visto que embriões são submetidos em condições e combinações diferentes de crioprotetores, mas podemos concluir que a morfologia é afetada pelos diferentes crioprotetores utilizados nesse trabalho, pela temperatura e pelo tempo de exposição aos mesmos, sendo essa característica muito variável.

A osmorregulação dos embriões submetidos à HEC, SAC e DMSO pode ter sido intensificada pelo aumento do tempo à exposição aos crioprotetores e ao congelamento, levando à grande variação na morfologia e que, no entanto continuaram seu desenvolvimento até 2 horas de exposição aos crioprotetores.

Além disso, o diâmetro do embrião (inclui tecido germinativo e o vitelo) não apresentou diferença significativa entre as 5 horas de exposição, porém, diferiu no congelamento entre os tratamentos controles

e a HEC e SAC combinadas ao DMSO, indicando que os crioprotetores chegaram pelo menos até a membrana do embrião, entretanto não foram suficientes para protegê-lo, ao longo do tempo, e/ou provavelmente não permearam por completo todo o embrião. Lahnsteiner (2008) observou que, para embriões de *D. rerio*, a altura da blástula e a espessura da gástrula diminuíram durante a exposição ao DMSO, associado à sacarose. Isso poderia ser um indício de desidratação e sugerem também que o tecido germinativo reagiu de maneira diferente do vitelo, indicando que a desidratação do vitelo de embriões de zebrafish é impossível com crioprotetores externos de rotina. Entretanto, os autores não mediram outras variáveis específicas de compartimentos embrionários.

A HEC e a SAC combinadas ao DMSO podem ser utilizadas durante 2 horas de congelamento a 0°C, mantendo a porcentagem de eclosão média de 60%. A HEC, associada ao DMSO, pode ser indicada como crioprotetor alternativo à utilização da sacarose com DMSO, visto que essas substâncias apresentaram características próximas a esses crioprotetores e baixíssima toxicidade aos embriões. As principais más formações encontradas foram edema do pericárdio, edema do saco vitelínico e má formação axial em todos os tratamentos, com valores baixos até 2 horas de exposição.

Zebrafish (*Danio rerio*) embryos cooled with hydroxyethyl cellulose and sucrose associated with dimethylsulfoxide

ABSTRACT

Different cryoprotectant solutions and exposure times were evaluated for toxicity and its effects on cooling *Danio rerio* embryos. In the toxicity tests, the embryos were submitted to the solutions R0: E3 medium; R1: Hydroxyethyl cellulose (HEC) 1.15×10^{-5} M and dimethylsulfoxide (DMSO) 1.28M, R2: E3 medium 1.15×10^{-5} M and DMSO 1.28M; R3: Sucrose (SUC) 0.5M and DMSO 1.28M; R4: E3 medium 0.5M and DMSO 1.28M for 1 to 5h of exposure (28°C) and evaluated larvae hatching. In cooling, the embryos were maintained at 0°C for 1 to 5 hours with the solutions: C1: 1.15×10^{-5} M HEC and DMSO 1.28M; C2: Negative control: E3 medium, C3: SUC 0.5M and DMSO 1.28M. C0 containing embryos on E3 medium was maintained at 28°C. After the exposure, the embryos were maintained at 28°C until hatching and, later, the larvae were evaluated (normal and abnormal). Embryos (n=5) were removed and images captured in order to evaluate: total area of the embryo (TA), average diameter of the corium (CD) and average diameter of the embryo (DE). The data were submitted to analysis of variance, regression analysis to determine the hatching percentages, depending on the exposure times in each solution, and the morphometric variables were evaluated by the Scott-Knott test ($P < 0.05$) using the R computational package. The average hatching percentage decreased with the exposure times to R2, R3, R4, C1, C2 and C3 ($P < 0.05$). The average percentage of abnormal larvae increased with exposure times for C2 and increased until 3h of exposure, and decreased in 4 and 5h (0%) for C3 and C4 ($P < 0.05$). We observed pericardial edema, yolk sac edema and axial malformation in all treatments. TA and CD were higher for C1 and C3 and increased from 1h to 2h of exposure, decreased at 3h and increased at 4h ($P < 0.05$). There was interaction between treatments for DE and we observed that, for C1, the averages decreased from 1h to 2h of exposure and remained until 5h and, for C3, the averages decreased from 1h to 2h of exposure, increased at 3h and 4h and decreased at 5h ($P < 0.05$). We conclude that the HEC and the SUC, combined with DMSO may be used for 2h of cooling at 0°C maintaining the average hatching percentage of 60%, and the main malformations found for all treatments were pericardial edema, yolk sac edema and axial malformation.

Keywords: Conservation. Cryoprotectants. Fish. Reproduction.

REFERÊNCIAS

- AHAMMAD, M. M.; BHATTACHAYYA, D.; JANA, B. B. The hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos in response to exposure to different concentrations of cryoprotectant at low temperatures. **Cryobiology**, San Diego, v. 44, n. 2, p. 114-121, Apr. 2002.
- AHAMMAD, M. M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B. B. The hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos stored at 4 and -2°C in different concentrations of methanol and sucrose. **Theriogenology**, Stoneham, v. 60, n. 8, p. 1409-1422, Nov. 2003.
- ALBAREDA-SIRVENT, M.; ARBEN, M.; SALVADOR, A. Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors: a review. **Sensors Actuators B**, Lausanne, v. 69, n. 1/2, p. 153-163, Sept. 2000.
- ANDRABI, S. M. H.; MAXWELL, W. M. C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 99, n. 3/4, p. 223-243, June 2007.
- CAVALETTI, G. et al. Effect on the peripheral nervous system of systemically administered dimethylsulfoxide in the rat: a neurophysiological and pathological study. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 118, n. 1/2, p. 103-107, Dec. 2000.
- CHEN, T.; WANG, Y.; WU, Y. Developmental exposures to ethanol or dimethylsulfoxide at low concentrations alter locomotor activity in larval zebrafish: implications for behavioral toxicity bioassays. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 102, n. 3/4, p. 162-166, Apr. 2011.
- DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, Stoneham, v. 48, n. 5, p. 831-841, Oct. 1997.

DI PRINZIO, C. M. et al. Growth hormone receptors in zebrafish (*Danio rerio*): adult and embryonic expression patterns. **Gene Expression Patterns**, Amsterdam, v. 10, n. 4/5, p. 214-225, June 2010.

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**, Stoneham, v. 50, n. 1, p. 1-13, July 1998.

FORNARI, D. C. et al. Effect of cryoprotectants on the survival of cascudo preto (*Rhinelepis aspera*) embryos stored at -8°C. **Zygote**, Cambridge, v. 19, n. 4, p. 345-350, Aug. 2011.

FORNARI, D. C. et al. Increasing storage capability of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos by chilling: development of a useful methodology for hatcheries management. **CryoLetters**, Lewes, v. 33, n. 2, p. 126-134, Mar./Apr. 2012.

HAFFTER, P. et al. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. **Development**, Cambridge, v. 123, n. 1, p. 1-36, Dec. 1996.

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

HALLARE, A. et al. Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 63, n. 3, p. 378-388, Mar. 2006.

KAJJARI, P. B.; MANJESHWAR, L. S.; AMINABHAVI, T. M. Semi-interpenetrating polymer network hydrogel blend microspheres of gelatin and hydroxyethyl cellulose for controlled release of theophylline. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 50, n. 13, p. 7833-7840, May 2011.

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

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 269, n. 1/4, p. 1-20, Sept. 2007.

LOPES, T. S. et al. Cooling of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos at various stages of development for 6 or 10 hours. **Theriogenology**, Stoneham, v. 75, n. 3, p. 570-576, Feb. 2011.

NEWMAN, M. et al. Zebrafish as a tool in Alzheimer's disease research. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alberta, n. 1812, p. 346-352, 2011.

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.

PENG, Z.; CHEN, F. Synthesis and properties of temperature-sensitive hydrogel based on hydroxyethyl cellulose. **International Journal of Polymeric Materials**, New York, v. 59, n. 6, p. 450-461, Apr. 2010.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 10 maio 2013.

RAHMAN, S. K. M. et al. Efficiency of osmotic and chemical treatments to improve the permeation of the cryoprotectant dimethyl sulfoxide to Japanese whiting (*Sillago japonica*) embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 75, n. 2, p. 248-255, Jan. 2011.

ROCHA, P. S. et al. Sediment-contact fish embryo toxicity assay with *Danio rerio* to assess particle-bound pollutants in the Tietê River Basin, São Paulo, Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 74, n. 7, p. 1951-1959, Oct. 2011.

SQUIRES, E. L. et al. **Cooled and frozen stallion semen**. Fort Collins: Colorado State University, 1999. 80 p. (Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Bulletin, 9).

STREIT, J. R. et al. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 8, p. 1119-1202, ago. 2007.

WOELDERS, H.; ZUIDBERG, A.; HIEMSTRA, S. J. Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: a poultry perspective. **Poultry Science**, Champaign, v. 85, n. 2, p. 216-222, Feb. 2006.

ZHANG, T. et al. Low temperature preservation of fish gonad cells and oocytes. In: BADIN, P. J.; CERDÀ, J. E.; LUBZENS, E. (Ed.). **The fish oocytes: from basic studies to biotechnological applications**. New York: Springer, 2007. p. 411-436.

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

ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Feasibility studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology**, San Diego, v. 33, n. 1, p. 1-13, Feb. 1996.

ZULKIFLI, F. H. et al. Cross-linking effect on electrospun hydroxyethyl cellulose/poly(vinyl alcohol) nanofibrous scaffolds. **Procedia Engineering**, Maryland Heights, v. 53, p. 689-695, 2013.

ARTIGO 3 Embriões de *Prochilodus lineatus* criopreservados com nanotubos de carbono, associados ao dimetilsulfóxido e a sacarose

Daniella Aparecida de Jesus Paula^{*}
Luis David Solis Murgas¹
Mônica Rodrigues Ferreira Machado²
Oswaldo Luis Alves³
Rafael Vilhena Reis Neto⁴
Cristina Delarete Drummond¹
Estefânia de Souza Andrade¹

**Artigo formatado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003),
conforme exigido pela UFLA.**

^{*} Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, Lavras-MG, 37200000. E-mail: daniufla2002@yahoo.com.br

¹ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, Lavras-MG, 37200000

² Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia-GO, 74605010.

³ Laboratório de Química do Estado Sólido, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 13081970

⁴ Universidade Estadual Paulista, Campus Experimental de Registro, Registro-SP, 11900000

RESUMO

Objetivou-se, neste trabalho, avaliar diferentes soluções crioprotetoras e diferentes tempos de exposição sobre a toxicidade e a criopreservação de embriões de curimba (*Prochilodus lineatus*). Embriões foram submetidos aos tratamentos: T0: Água destilada; T1: Dimetilsulfóxido (DMSO) 7,8%; T2: Nanotubos de carbono (NTCs) 120 mg/mL; T3: Sacarose (SAC) 17,1%; T4: DMSO 7,8% + SAC 17,1% + NTCs 40 mg/mL; T5: DMSO 7,8% + SAC 17,1% + NTCs 60 mg/mL; T6: DMSO 7,8% + SAC 17,1% + NTCs 120 mg/mL por 15, 60 e 105 minutos. Foram avaliadas a porcentagem de larvas (vivas normais, vivas malformadas e mortas) e mensuradas a área total do embrião (AT), o diâmetro médio do cório (DC) e o diâmetro médio do embrião (DE). Embriões (n=6) foram fixados, para avaliar seu desenvolvimento e presença dos NTCs. Embriões (n=12) após os tratamentos foram decorionados, acondicionados em palhetas com as respectivas soluções e mantidos em nitrogênio líquido por 6 meses. As palhetas foram descongeladas à 36°C por 15" (TD1) e à 60°C por 6" (TD2) e os embriões avaliados quanto a integridade morfológica e desenvolvimento. Os dados foram submetidos análise de variância, utilizando-se o pacote computacional R. Observou-se uma menor porcentagem de larvas vivas para T5 no teste de toxicidade ($P<0,05$). Houve interação entre soluções e tempo de exposição para a DC, sendo maior para T0, T2, T3 e T4 ($P<0,05$), aos 15 minutos de exposição. DE foi menor aos 15 minutos de exposição ($P<0,05$). Os embriões apresentaram desenvolvimento normal e foi identificada a presença dos NTC's nas diferentes amostras, exceto em T0. A porcentagem média de embriões íntegros foi maior para T3 na TD2 e para T6 na TD1 ($P<0,05$). A porcentagem média de embriões íntegros na TD1 foi maior para T5 e menor para T0 e em TD2 foi maior para T3 e T5 e menor para T0 e T6 ($P<0,05$). Nenhum embrião avançou no desenvolvimento embrionário pós-descongelamento. Os NTCs associados ao DMSO e sacarose não são tóxicos aos embriões de curimba, porém não foram suficientes em protegê-los no congelamento/descongelamento. No entanto, os NTCs adentraram os embriões e mantiveram alta porcentagem de embriões íntegros.

Palavras-chave: Conservação. Crioprotetores. Nanotubos de carbono. Peixes. Reprodução.

1 INTRODUÇÃO

O Curimba (*Prochilodus lineatus*) é uma espécie de piracema, nativa da América do Sul (REIS; KULLANDERS; FERRARIS-JUNIOR, 2003) e que representa um papel importante no seu ecossistema, bem como na subsistência e na pesca comercial no Sul do Brasil. Entretanto, seu ciclo reprodutivo é afetado pela poluição, pesca predatória, desmatamento, construção de barragens e pelas modificações nos cursos dos rios (VIVEIROS et al., 2009). Estudos com foco na reprodução dessa espécie são recomendados, a fim de prevenir a diminuição dos estoques e assegurar a sua permanência (CUADRADO et al., 2013).

A criopreservação de embriões pode contribuir para a preservação do germoplasma materno e paterno e já é apontada como complemento para biotecnologias como a clonagem e utilização de transgênicos. Entretanto, apesar da crescente utilização dessa técnica em mamíferos ainda não existem relatos de resultados satisfatórios para embriões de peixes (ROBLES; CABRITA; HERRÁEZ, 2009). Estudos utilizando protocolos de criopreservação foram descritos para *Prochilodus lineatus* (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2009), para *Brachydanio rerio* (HAGEDORN et al., 1997), para *Sparus aurata* (CABRITA et al., 2006) e para *Piaractus Mesopotamicus* (FORNARI et al., 2011). Porém, há poucos trabalhos que indicam os caminhos e as respostas para buscar o protocolo efetivo.

A criopreservação sustentaria o fornecimento constante de animais que são obtidos somente em determinadas épocas do ano, diminuindo custos e reduzindo o impacto da aquicultura, mantendo a produtividade, minimizando o impacto do cultivo de peixes e de falhas decorrentes de

erro humano, desastres naturais e epidemias (HAGEDORN; KLEINHANS, 2011).

Algumas características dos embriões de peixes são apontadas como determinantes no insucesso da criopreservação: grande tamanho do embrião, que retardaria o efluxo e influxo de água e crioprotetores; conteúdo grande como, por exemplo, presença do vitelo que aumentaria a probabilidade de rupturas por formação de gelo; a permeabilidade dos diferentes compartimentos e a semipermeabilidade de membranas que circundam o embrião que também podem interferir no influxo e efluxo de água e crioprotetores (HAGEDORN et al., 2004; NINHAUS-SILVEIRA et al., 2009; RALL, 1993).

Os crioprotetores são substâncias essenciais ao processo de criopreservação e agem desidratando as células e protegendo as membranas durante o influxo e efluxo de água e crioprotetor dos embriões. O dimetilsulfóxido e a sacarose são exemplos típicos de crioprotetores intra e extracelulares comumente utilizados pelos pesquisadores (LAHNSTEINER, 2008), porém, a combinação dos crioprotetores intracelulares e extracelulares pode favorecer uma maior proteção à célula do que seu uso isolado (DALIMATA; GRAHAM, 1997). Os protocolos de congelamento são compostos, em sua maioria, pelos crioprotetores utilizados na criopreservação de sêmen, todavia novas substâncias devem ser testadas na tentativa de se obter um protocolo para embriões.

A nanotecnologia é uma ciência emergente e proporciona diversas aplicações nos aparelhos eletrônicos, nos sensores biológicos e químicos e nos biomateriais (CHENG et al., 2009). Há previsões de que a produção

de nanotubos de carbono (NTC) atingirá centenas de milhões de toneladas por ano (PUMERA, 2012).

Nanotubos de carbono de múltiplas camadas (MWCNTs) ganharam popularidade devido a sua estrutura única, unidimensional (oca) e suas propriedades físico-químicas (PATLLOLA; KNIGHTEN; TCHOUNWOU, 2010). Provavelmente, é um dos materiais mais resistentes e suas propriedades são decorrentes da estrutura de seus átomos de carbono que lhes confere muita força, flexibilidade e resistência (SALVETAT et al., 1999). Além disso, esses materiais são altamente flexíveis e não quebram e nem sofrem danos estruturais quando dobrados ou submetidos à alta pressão (ELETSKII, 2007). Recentemente, os NTCs surgem ainda como opção em metodologias no tratamento do câncer, na bioengenharia e na terapia gênica (FIRME; BANDARU, 2010).

Os NTC's apresentaram capacidade de trafegar através de diferentes barreiras celulares (FIRME; BANDARU, 2010; ZHANG et al., 2007), sendo assim, poderiam constituir um crioprotetor que penetraria o embrião e o protegeria durante o congelamento e descongelamento. Objetivou-se, neste trabalho, testar diferentes soluções crioprotetoras e diferentes tempos de exposição e avaliar seus efeitos na toxicidade e na criopreservação de embriões de curimba.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Embriões

O experimento foi conduzido em Fevereiro de 2013, na Estação Ambiental de Itutinga da Companhia Energética de Minas Gerais (EAI-

CEMIG), localizada na cidade de Itutinga, Minas Gerais. Os animais (*Prochilodus lineatus*) foram selecionados pela massagem abdominal, para checar a liberação de sêmen no caso dos machos e pela avaliação da papila urogenital nas fêmeas (proeminente e com coloração avermelhada).

Os animais selecionados, conforme descrito, acima foram mantidos em aquários de alvenaria e receberam a aplicação intramuscular de extrato bruto de hipófise de carpa nas doses de 0,5 e 5 mg/Kg ou 0,4 e 4 mg/Kg de peixe, para as fêmeas e machos, respectivamente. A aplicação do hormônio foi intramuscular e próxima da nadadeira dorsal, em intervalos de 12 horas (MURGAS et al., 2007; NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006). Após, aproximadamente, 24 horas da dose inicial, a papila urogenital foi limpa e seca para prevenir a ativação e contaminação dos gametas com água, urina e fezes. Em seguida, foi realizada uma massagem manual e suave na cavidade celomática na direção crânio-caudal para promover a liberação dos gametas.

Foi utilizado um pool de embriões de 2 casais de curimba com peso médio de 1200 ± 283 g, para as fêmeas e de 735 ± 257 g, para os machos.

Os gametas primeiramente foram acondicionados juntos em beakers (fertilização a seco) e, posteriormente, foi adicionada a água das incubadoras, e então colocados, logo em seguida, nas incubadoras tipo funil (capacidade de 200L).

Os embriões foram coletados após a fertilização e transportados em sacos plásticos, contendo a água das incubadoras (aproximadamente 30 L; 27°C) e oxigênio até o Biotério da Universidade Federal de Lavras,

Lavras-MG (distante, aproximadamente, 40 Km de Itutinga-MG, 50 minutos de carro). No biotério, os embriões foram acondicionados nas incubadoras experimentais de manutenção (IEM) (Figura 1) , onde permaneceram por, aproximadamente 6 horas, quando ocorreu o fechamento do blastóporo na temperatura de 27°C.

As IEM (Figura 1) foram feitas com tubos de policloreto de vinila (PVC) (7,5 cm diâmetro, 12 cm altura) e essas foram alocadas em bandejas de plástico com capacidade para 15 L e ocupadas com mangueiras porosas de 105cm (BOYU[®]), ligadas à um compressor de ar Big Air A420, para oxigenação constante da água. Além disso, o sistema possuía um filtro biológico e um termostato Hopar Aquarium Heater H-606, para manutenção da qualidade e temperatura da água (27°C), respectivamente. O sistema de incubadoras é um sistema fechado, com recirculação de água através de uma bomba Atman Power Head AT-304, com capacidade de até 800L/h.

Foram coletados $100 \pm 17,92$ embriões do pool dos casais de curimba, para cada incubadora (2/tratamento).



Figura 1 - Imagens das incubadoras de manutenção (IEM)

Nota: A: imagem das incubadoras; B e D: vista interna das incubadoras com destaque para a mangueira de oxigenação juntamente com o compressor de ar e o termostato; C: temperatura da água das incubadoras.

2.2 Toxicidade

Os embriões foram avaliados em esteromicroscópio MOTIC[®], de hora em hora, até atingirem a fase de fechamento de blastóporo e então transferidos para as incubadoras experimentais de tratamento (IET) (Figura 2) e um teste de toxicidade a 26°C foi conduzido para avaliar em 3 tempos de exposição 15 60 e 105 minutos, o efeito dos seguintes tratamentos sobre os embriões: T0: Água destilada; T1: Dimetilsulfóxido (DMSO) 7,8%; T2: Nanotubos de carbono (NTC) 120 mg/mL; T3: Sacarose 17%; T4: DMSO 7,8% + Sacarose 17,1% + NTC 40 mg/m; T5: DMSO 7,8% + Sacarose 17,1% + NTC 60 mg/mL; T6: DMSO 7,8% +

Sacarose 17,1% + NTC 120 mg/mL (CHENG; FLAHAUT; CHENG, 2007).

Os nanotubos de carbono de multicamadas (MWCNT) (0,5 mg/mL), utilizados no experimento foram gentilmente doados pelo Dr. Oswaldo Luis Alves (Unicamp) e adquiridos da CNT Co. Ltd., Incheon - Coréia do Sul. Foi realizado um tratamento com ácido nítrico, necessário para suspender os NTC em água e aumentar sua pureza, em que o MWCNT bruto (1,0 g) foi submetido ao refluxo em HNO_3 9,0 mol/L (200 mL), durante 12h a 150°C. Após resfriar em temperatura ambiente, foram filtrados em uma membrana de PTFE (politetrafluoroetileno) de 0,2 μm e lavou-se com água deionizada até atingir um pH neutro do filtrado. A amostra HNO_3 -MWCNT foi seca num sistema de vácuo, durante 24h. Uma solução estoque foi preparada com 100 mg of HNO_3 -MWCNT dispersa em 200 mL de água deionizada e sonicado por 1 hora em um banho de ultrassom Cole-parmer 8891 (MARTINEZ; ALVES; BARBIERI, 2013).

As IET foram confeccionadas com tubos de policloreto de vinila (PVC) (7,5 cm diâmetro, 5 cm, altura 170 mL de capacidade, aproximadamente) e alocadas sobre um suporte de isopor (47 cm de comprimento e 32 cm de largura), com uma pedra porosa centralizada em todas as incubadoras e unidas entre si por conectores de plástico vinculadas ao compressor de ar Big Air A420. Além disso, o sistema de incubadoras foi mantido em uma sala com temperatura controlada que auxiliava na manutenção da temperatura média de 26°C (Fig. 2). O sistema de incubadoras é um sistema fechado, sem recirculação de água e

com aeração constante para manter a exposição dos embriões nas diferentes concentrações de soluções, durante a exposição.

Decorrido o tempo determinado de exposição, os embriões foram filtrados das soluções e voltaram para IEM, contendo apenas água para continuarem o desenvolvimento até a eclosão e consequente avaliação das larvas em estereomicroscópio MOTIC[®] sendo classificadas em: porcentagem de larvas vivas normais (LV), porcentagem larvas vivas malformadas (LVMF), porcentagem de larvas mortas (LMO).



Figura 2 - Incubadoras experimentais de tratamento (IET)

Foi retirada uma amostra de 5 embriões de cada tratamento com o auxílio de uma pipeta e capturadas imagens após os tratamentos em microscópio de luz Olympus CX31 e avaliadas no programa IMAGE J, para análise da influência dos crioprotetores na morfologia do embrião. Foram consideradas as medidas da área total do embrião (AT), do

diâmetro médio do cório (CD) e o diâmetro médio do embrião (ED) em μm (Figura 3).

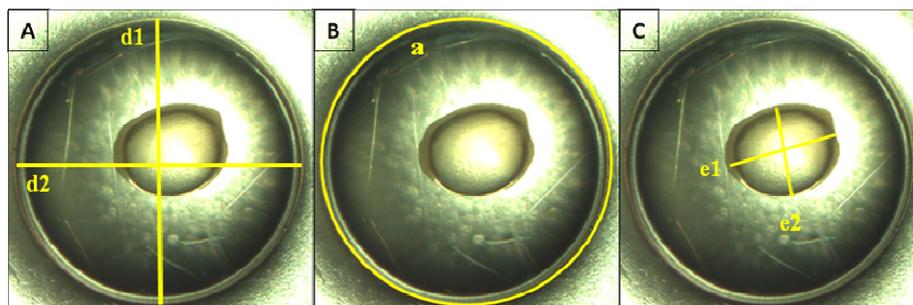


Figura 3 - Análise morfométrica dos embriões de curimba durante a incubação com Sacarose, DMSO e Nanotubos de Carbono a 27°C

Nota: (A) d1, d2: diâmetro do cório; diâmetro médio do cório (CD) = $(d1+d2/2)$; (B) a: área do embrião (AT); (C) e1, e2: diâmetro do embrião; diâmetro médio do embrião (ED) = $(e1+e2/2)$.

2.3 Microscopia de luz e eletrônica de transmissão

Foi retirada outra amostra de 6 embriões de cada tratamento e fixadas em solução de glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2,5%), em tampão cacodilato, pH 7,0, 0,05M + CaCl_2 0,001M, em temperatura ambiente. Após um mês, os embriões (n=3) foram lavados em tampão cacodilato 0,05M e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% com o mesmo tampão, por quatro horas. Em seguida, o material foi desidratado em série cetônica, incluído em resina Spurr e dos blocos obtidos foram feitas seções ultrafinas ($<100\text{nm}$), com o auxílio de ultramicrotomo Reichert-Jung. Os cortes foram pós-contrastados em acetato de uranila, seguido por acetato de chumbo, e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss - EM 109), para observar a presença dos NTC's.

Outra amostra (n=3) foi incluída em resina e os cortes foram feitos em micrótomo (Leica RM2235), corados com hematoxilina e eosina (HE) e capturadas imagens em microscópio de luz (Olympus CX31), para observar a influência dos NTC's nos tecidos dos embriões.

2.4 Criopreservação e descongelamento

Para o congelamento, todos os embriões que passaram pelos tempos e soluções no experimento de toxicidade foram decorionados (remoção da membrana externa do embrião – o cório) e acondicionados em palhetas de 0,5 mL (n=12 embriões por palheta), com a ajuda de uma seringa adaptada para puxar os embriões para dentro das palhetas juntamente com as mesmas soluções do teste de toxicidade. As palhetas contendo os embriões foram vedadas com massa cirúrgica estéril e submetidas à seguinte curva de congelamento no biocongelador Biocom *Dominium K*[®]:

Temperatura inicial positiva de 10°C

Rampa 1: -1°C/minuto

Temperatura inicial negativa: -1°C

Tempo de estabilização: 5 minutos

Ponto de cristalização: 1 minuto

Rampa 2: -1°C/minuto

Temperatura final: -10°C

Tempo de estabilização final: 10 minutos.

Em seguida, as palhetas foram acondicionadas em botijão de nitrogênio líquido, por 6 meses. Posteriormente ao período de congelamento, as palhetas foram retiradas do botijão de nitrogênio líquido e mergulhadas em banho-maria, com temperatura controlada de 36° por 15 segundos (TD1) e 60°C por 6 segundos (TD2), adaptado de Ninhaus-Silveira et al. (2009). As extremidades das palhetas foram cortadas e os embriões retirados, drenadas as soluções por uma peneira, levados até as IEM (27°C), contendo apenas água e mantidos até a possível eclosão.

Após 30 minutos de descongelamento, os embriões de todas as palhetas foram avaliados em estereomicroscópio MOTIC® quanto a sua morfologia e desenvolvimento. Foi avaliada a porcentagem de embriões íntegros. Foram considerados como embriões íntegros: embriões que apresentaram morfologia completa dos órgãos e tecidos comum à espécie; e não íntegros: aqueles embriões que não apresentavam morfologia perfeita dos tecidos e órgãos.

Para os cálculos foram consideradas a quantidade de embriões íntegros sobre o total de embriões congelados em porcentagem. Os embriões foram novamente avaliados 3 horas pós-descongelamento para detectar avanços no desenvolvimento embrionário.

2.5 Análise estatística

Foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) e os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 7x3 (7 soluções + 3 tempos de exposição) para o teste de toxicidade e a criopreservação, e 7x3x2 (7 soluções + 3 tempos de exposição + 2 temperaturas), para o descongelamento.

Os dados em todas as análises foram testados quanto à normalidade, independência dos resíduos e homocedasticidade de variâncias e submetidos à análise de variância ($\alpha=0,05$), considerando um esquema fatorial de tratamento.

Posteriormente, para a variável LV e LMO foi realizado um teste de média para comparar o efeito das diferentes soluções. Para a variável CD foi realizado um teste de média para as soluções nos diferentes tempos de exposição e para ED um teste de média para comparar os diferentes tempos de exposição. Para a variável porcentagem de embriões íntegros foi realizado um teste de médias para as soluções, em função das diferentes temperaturas. O teste de média utilizado para todas as variáveis foi o Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Em todas as análises estatísticas foi utilizado o pacote computacional R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013).

3 RESULTADOS

3.1 Toxicidade

Houve diferença entre os tratamentos para a porcentagem média de eclosão das larvas ($P<0,05$), sendo essa menor para o T5 (Tabela 1).

Houve interação entre as soluções e o tempo de exposição para a variável CD e observa-se que as médias foram maiores para T0, T2 e T3 T4 ($P<0,05$), quando comparados aos demais tratamentos aos 15 minutos de exposição (Tabela 2).

Avaliando-se os diferentes tempos de exposição, pode-se observar que o ED foi diferente ao longo do tempo, sendo menor aos 15 minutos de exposição ($P<0,05$), quando comparado aos demais tempos (Tabela 2).

Tabela 1 - Porcentagem média de eclosão das larvas vivas, larvas vivas e malformadas, e larvas mortas de embriões de *P. lineatus* submetidos ao teste de toxicidade, com diferentes crioprotetores

Variável	Trat. ⁴	Tempo exposição (minutos)			Média*
		15	60	105	
LV ¹	T0	98,45	98,41	98,14	98.39 ±0,97a
	T1	98,27	98,68	98,24	98.40 ±1a
	T2	99,07	98,38	98,79	98.74 ±0,92a
	T3	98,35	98,40	97,51	98.04±1,70a
	T4	98,57	98,43	98,53	98.51 ±0,99a
	T5	97,44	97,93	96,69	97.35±1,69b
	T6	98,15	98,08	98,43	98.22 ±1,45a
Média		98,35±1,39	98,33±10	98,02±1,52	
LVMF ²	T0	0,79	0,81	0,81	0,80±0,71
	T1	0,95	0,58	0,79	0,78±0,83
	T2	0,55	0,90	0,81	0,75±0,70
	T3	1,22	1,42	1,35	1,33±0,99
	T4	0,80	1,06	0,58	0,84±0,87
	T5	1,34	0,94	1,34	1,11±1,11
	T6	0,90	1,12	0,63	0,88±0,88
Média		0,91±0,90	0,98±0,81	0,90±0,96	
LMO ³	T0	0,80	0,78	1,96	0,80±0,77b
	T1	0,82	0,74	0,97	0,82 ±0,70b
	T2	0,49	0,71	0,40	0,49± 0,73b
	T3	0,63	0,17	1,28	0,63±1,01 b
	T4	0,64	0,51	0,89	0,64 ±0,65b
	T5	1,53	1,13	1,97	1,53±1,04 a
	T6	0,89	0,79	0,93	0,89±1,17b
Média		0,738±0,983	0,693±0,863	1,071±0,902	

*Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes entre si (Scott-Knott; P<0,05).

¹LV: larvas vivas; ²LVMF: larvas vivas e malformadas; ³LMO: larvas mortas.

⁴Tratamentos.

Tabela 2 - Área total (AT) em μ^2 , diâmetro médio do cório (CD) e diâmetro médio do embrião (ED) em μm dos embriões de *P. lineatus* submetidos ao teste de toxicidade com diferentes crioprotetores

Variável	Trat. ⁴	Tempo exposição (minutos)			Média
		15	60	105	
AT ¹	T0	2431,4	2352,5	2321,4	2353,3±93,9
	T1	2294,7	2325,4	2340,4	2320,1±86,9
	T2	2413,1	2302,1	2371,1	2362,1±75,7
	T3	2380,5	2369,6	2393,3	2381,1±49,8
	T4	2353,7	2362,3	2382,3	2366,1±48
	T5	2289,0	2347,7	2416,5	2336±60,57
	T6	2307,2	2318,5	2436,6	2354,1±79,5
Média		2346,3±75,7	2339,7±68,0	2373,8±72,2	
CD ^{2*}	T0	4739,8±95,4a	4720,5	4592,4	4684,2±164,2
	T1	4557,1±209,1b	4605,6	4627,7	4596,8±156,8
	T2	4778,7±75,4a	4563,9	4661,8	4668,1±143,3
	T3	4735,3±126,6a	4691,5	4723,4	4716,7±100,0
	T4	4655,8±102,7a	4670,6	4713,4	4680,0±96,9
	T5	4553,5±34,2b	4650,5	4687,9	4630,6±114,2
	T6	4560,9±99,4b	4582,1	4806,5	4649,8±143,3
Média		4654,4±140,7	4640,7±127,1	4687,3±135,8	
ED ³	T0	1506,4	1428,6	1572,3	1502,4±196,3
	T1	1507,1	1563,6	1618,0	1562,9±137,9
	T2	1389,0	1585,7	1604,8	1526,5±159,0
	T3	1492,0	1596,5	1625,7	1571,4±65,4
	T4	1417,7	1571,6	1553,2	1514,1±124,9
	T5	1409,8	1541,1	1598,2	1516,4±128,3
	T6	1479,3	1553,9	1571,0	1534,7±84,2
Média*		1457,3±137,2b	1548,7±124,4a	1591,9±98,6a	

*Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes entre si (Scott-Knott; P<0,05).

¹AT: área total; ²CD: diâmetro do cório; ³ED: diâmetro do embrião.

⁴Tratamentos.

3.2 Microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão

Todos os embriões observados, tanto do controle quanto dos tratamentos, apresentaram um desenvolvimento embrionário normal para a espécie, com definição e integridade das células e organelas.

Foi caracterizada a fase de final da gástrula e início da segmentação/organogênese dos embriões, com destaque para as regiões cefálica e caudal, o mesoderma, a camada sincicial vitelínica/vitelo íntegros, a notocorda organizada e a formação do tubo neural.

Nos embriões com 105 minutos de exposição aos crioprotetores foi possível observar ainda a presença os somitos e o crescimento e alongamento do embrião através do eixo céfalo-caudal. (Figura 4, 5, 6 e 7).

Foi identificada a presença dos NTC's nas diferentes amostras sob a microscopia eletrônica de transmissão, exceto no tratamento controle (Figuras 8, 9 e 10).

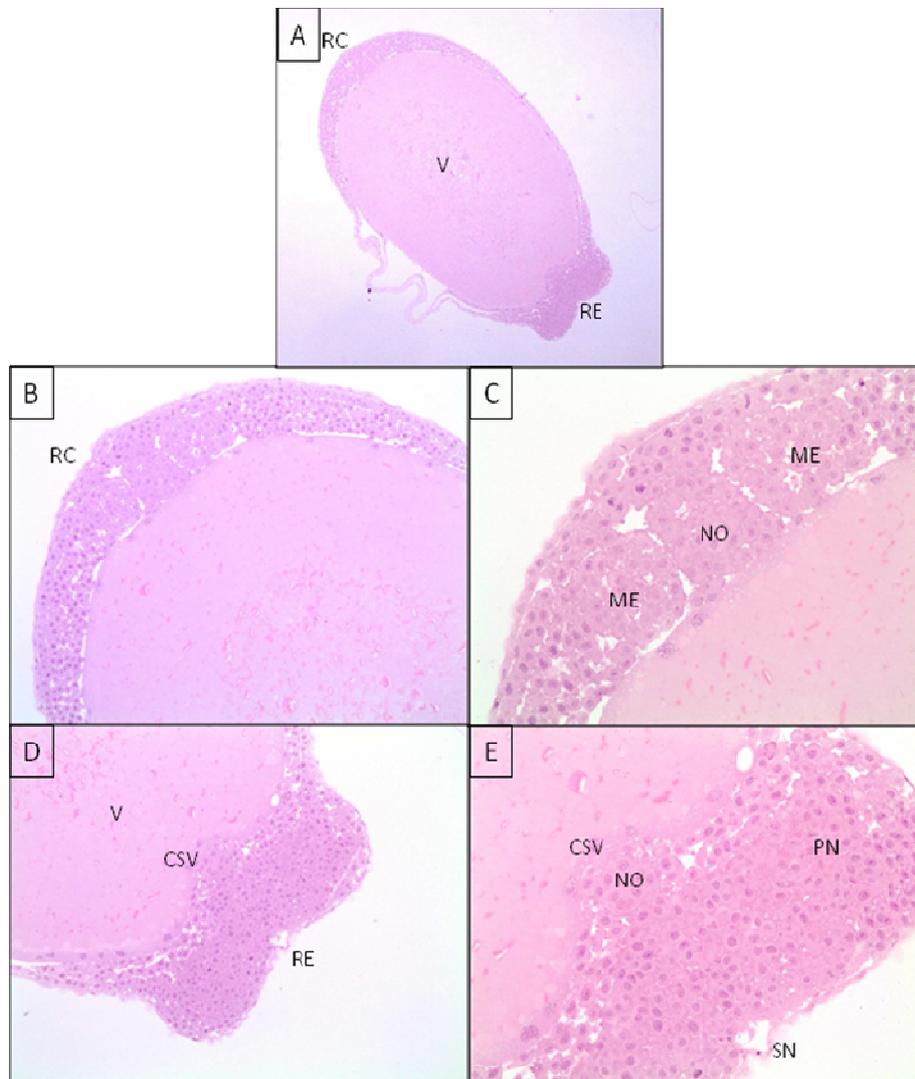


Figura 4 - Análise em microscópio de luz de embriões de *P. lineatus*, corados com HE, submetidos ao T0 e com 60 minutos de exposição

Nota: A: visão total do embrião (Objetiva 4x); B e C: região caudal (RC) (Objetiva de 20 e 40x respectivamente); D e E: região encefálica (RE) (Objetiva de 20 e 40x respectivamente). V: vitelo; ME: mesoderma; NO: notocorda; CSV: camada sincicial de vitelo; PN: placa neural; SN: sulco neural.

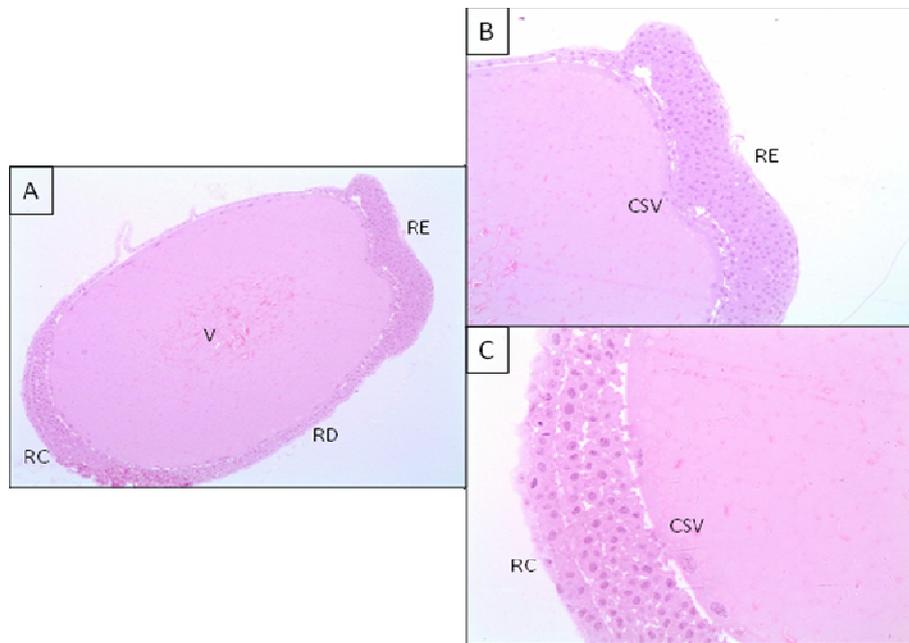


Figura 5 - Análise em microscópio de luz de embriões de *P. lineatus*, corados com HE, submetidos ao T5 e com 60 minutos de exposição

Nota: A: visão total do embrião (Objetiva 10x); B: região encefálica (RE) (Objetiva de 20x) e C: região caudal (RC) (Objetiva de 40x). V: vitelo; RD: região dorsal; CSV: camada sincicial de vitelo.

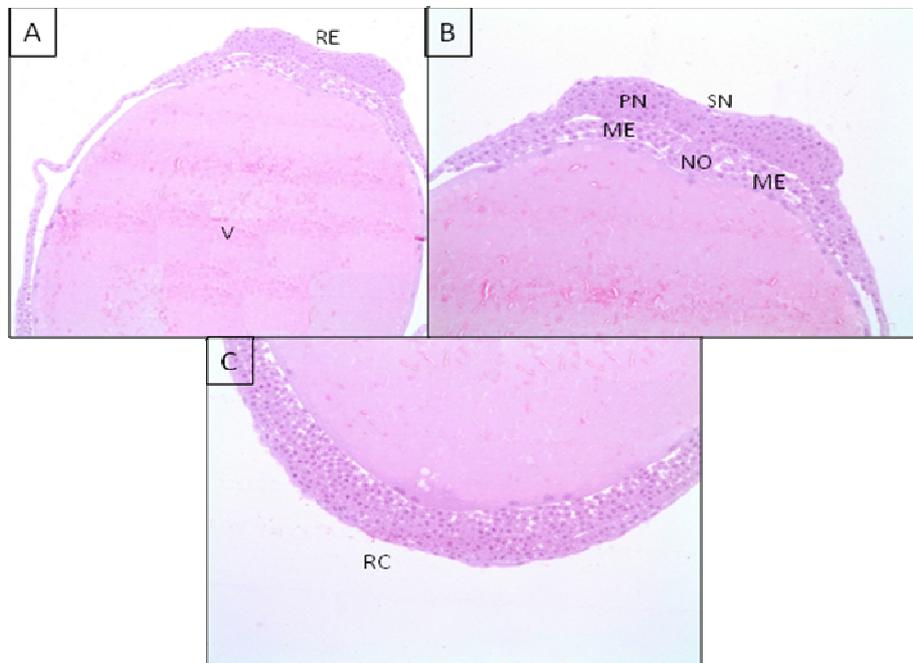


Figura 6 - Análise em microscópio de luz de embriões de *P. lineatus*, corados com HE, submetidos ao T6 e com 60 minutos de exposição

Nota: A: região encefálica (RE) (Objetiva 10x); B: região encefálica (RE) (Objetiva de 20x); C: região caudal (RC) (Objetiva de 20x). V: vitelo; ME: mesoderma; NO: notocorda; PN: placa neural; SN: sulco neural.

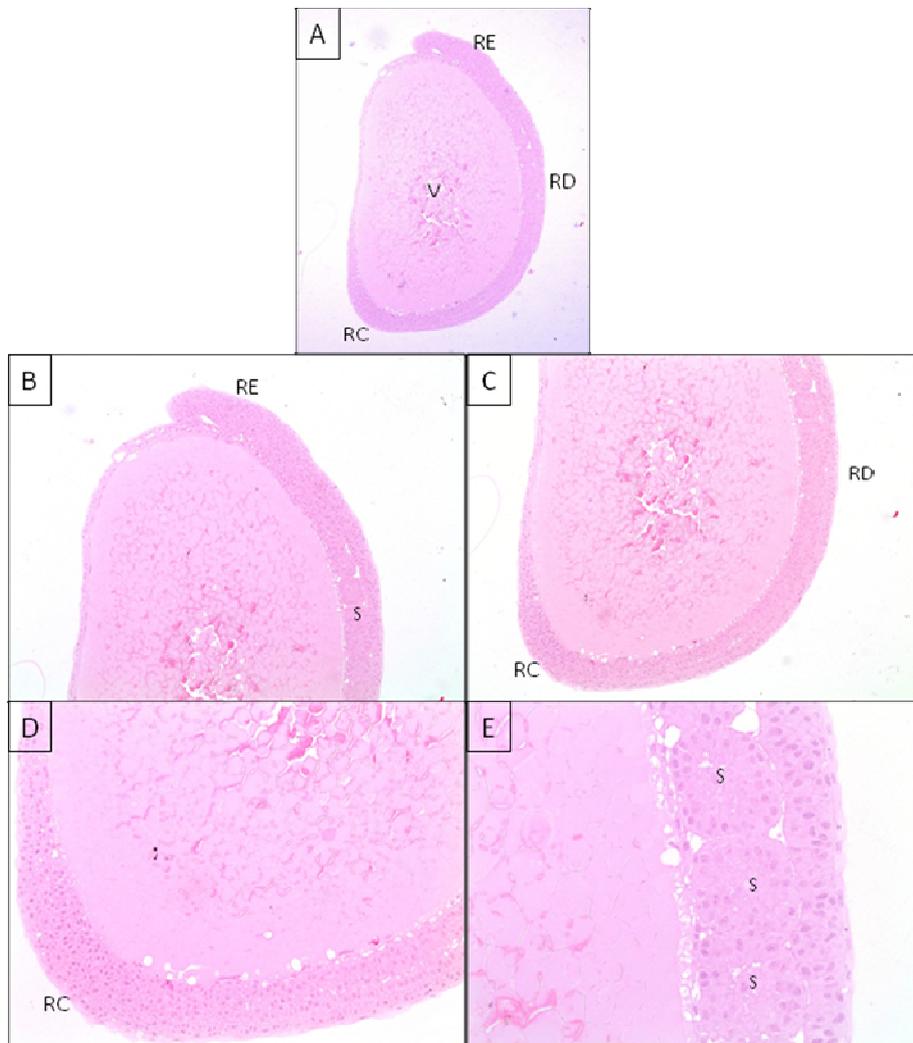


Figura 7 - Análise em microscópio de luz de embriões de *P. lineatus*, corados com HE, submetidos ao T5 e com 105 minutos de exposição

Nota: A: visão total do embrião (Objetiva 4x); B: região encefálica (RE) e somitos (S) na região dorsal (RD) (Objetiva de 10x); C: região caudal (RC) (Objetiva de 10x); D: região caudal (RC) e E: somitos (Objetiva de 40x). V: vitelo.

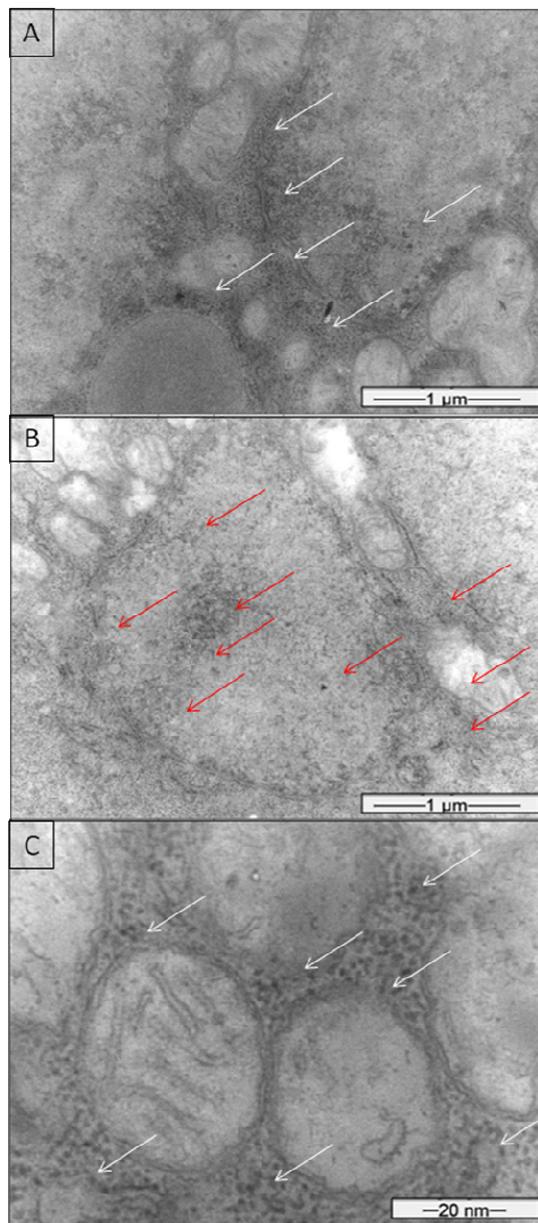


Figura 8 - Análise em microscópio eletrônico de transmissão de embriões de *P. lineatus* submetidos ao T3 por 105 minutos de exposição ao nanotubos de carbono

Nota: As setas indicam a presença dos nanotubos de carbono na amostra.

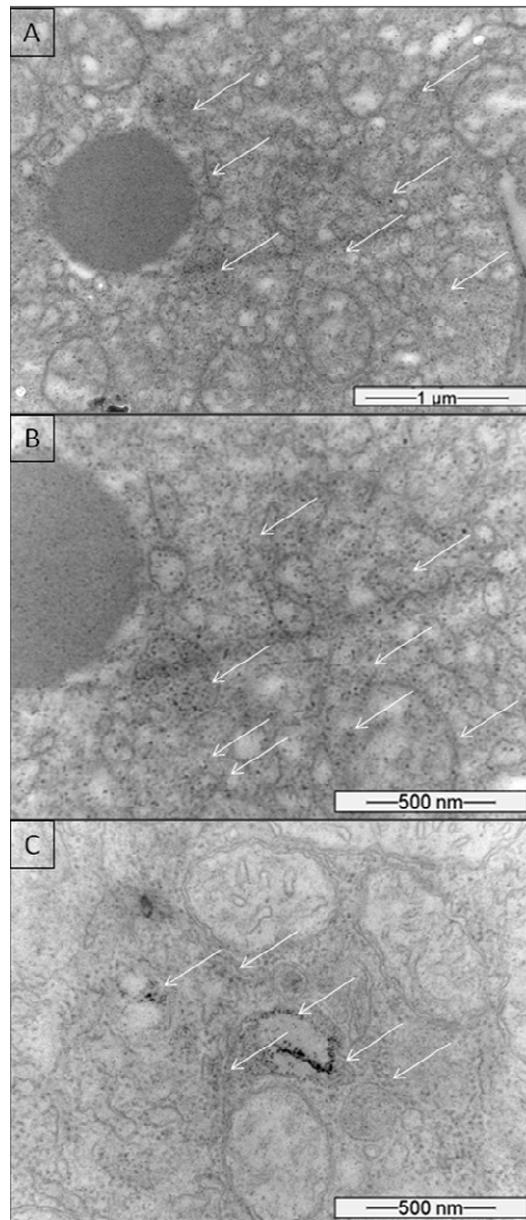


Figura 9 - Análise em microscópio eletrônico de transmissão de embriões de *P. lineatus* submetidos ao T4 por 105 minutos de exposição ao nanotubos de carbono

Nota: As setas indicam a presença dos nanotubos de carbono na amostra.

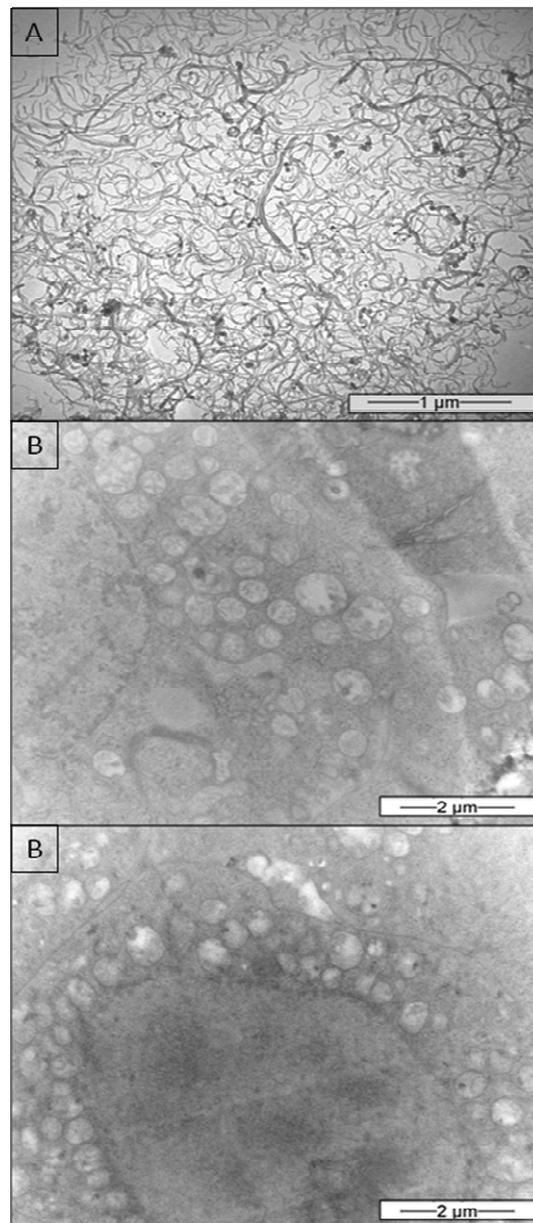


Figura 10 - Análise em microscópio eletrônico de transmissão dos NTCs utilizados no experimento (A)

Nota: Embriões de *P. lineatus* submetidos ao T0 por 105 minutos de exposição em água, evidenciando a ausência dos nanotubos de carbono (B e C).

3.3 Descongelamento

Houve interação apenas entre as soluções e as temperaturas de descongelamento (TD). Quando avaliou-se a temperatura e o tempo de descongelamento foi verificado que somente T3 e T6 apresentaram diferença ($P<0,05$). O T3 e T5 apresentaram porcentagem média de embriões intactos maior em TD2, e o T6 apresentou maior porcentagem de embriões intactos em TD1 ($P<0,05$) (Tabela 3).

Os embriões que foram avaliados como íntegros e não íntegros estão representados na Figura 11.

Às 3 horas pós-descongelamento, nenhum embrião apresentou avanços no desenvolvimento embrionário.

Tabela 3 - Porcentagem média de embriões íntegros de *P. lineatus* submetidos a diferentes tratamentos e diferentes temperaturas de descongelamento

Tratamento	Temperatura		Média
	TD1 36°C 15''	TD2 60°C 6''	
T0	0,92±2,77Ae	0,93±2,78Ae	0,92±2,69
T1	33,67±7,28Ac	28,02±5,51Ac	30,85±7,01
T2	27,77±5,89Ad	25,92±14,43Ac	26,85±5,38
T3	62,03±9,41Bb	70,37±6,05Aa	66,20±8,79
T4	62,03±6,05Ab	62,96±9,10Ab	62,5±5,15
T5	71,63±7,76Aa	71,29±7,34Aa	71,46±7,33
T6	25,00±7,21Ad	17,84±8,48Be	21,42±7,76
Média	40,44±24,66	39,62±26,94	

*Médias seguidas por letras diferentes e maiúsculas nas linhas e diferentes e minúsculas nas colunas são significativamente diferentes entre si (Scott-Knott; $P<0,05$).

¹TD: temperatura de descongelamento.

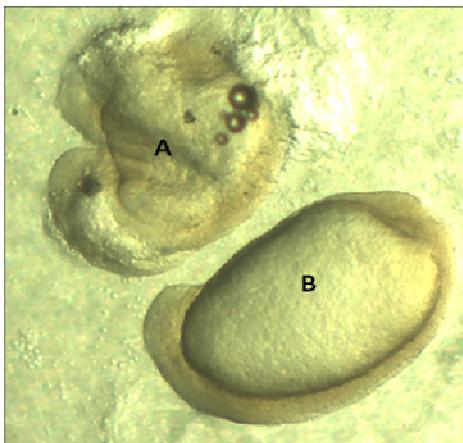


Figura 11 - Embriões de *P. lineatus* submetidos ao T5 e descongelados à TD2

Nota: A: embrião considerado não íntegro e B: embrião considerado íntegro. Aumento de 3x.

4 DISCUSSÃO

Os resultados indicam que os crioprotetores foram pouco tóxicos para os embriões de curimba e apenas T5 apresentou uma porcentagem menor de larvas vivas que os outros tratamentos, e conseqüentemente maior porcentagem de larvas mortas. Entretanto, mesmo com porcentagens menores em relação aos outros tratamentos, uma taxa de $97,35 \pm 1,69\%$ é considerada muito alta se observarmos que diversos autores utilizam o tratamento controle com taxas de eclosão acima de 80% (STREIT JUNIOR et al., 2007), e taxa média de larvas vivas de 90,6% (LOPES et al., 2011).

Os NTCs não são comumente utilizados como crioprotetores, entretanto apresentaram pouca toxicidade confirmada pelo desenvolvimento normal dos embriões e pela alta porcentagem de larvas vivas normais. Também foram capazes de atravessar as membranas dos

embriões, confirmados pelas imagens de microscopia eletrônica de transmissão.

Estes são os primeiros relatos na literatura científica sobre o uso de nanotubos de carbono na criopreservação de embriões de *P. lineatus*. Os embriões observados na microscopia de luz demonstraram o desenvolvimento embrionário normal para a espécie, com definição e integridade das células e organelas em que pôde-se caracterizar a fase final da gástrula e início da segmentação/organogênese, para todos os tratamentos testados. No presente experimento, os animais foram expostos a curtos períodos e provavelmente não foram suficientes para levar a graves efeitos tóxicos, entretanto a segunda geração dos embriões submetidos aos MWCNTs não foram avaliados, sugerindo novos estudos nas condições experimentadas.

Os resultados de baixa toxicidade encontrados no presente trabalho estão de acordo com o de Cheng et al. (2009), que avaliaram embriões de *Danio rerio* expostos à BSA-MWCNTs (Soro fetal albumina- NTCs de múltiplas camadas) e PPEI-EI-MWCNTs (Poli etilenimina propionil-co-etilenimina - NTCs de múltiplas camadas), por microinjeção no estágio de 1 célula e microinjeção no sistema cardiovascular, com 72h pós-fertilização e concluíram que MWCNTs modificados e purificados não exercem efeitos tóxicos graves, quando carregados em zebrafish, confirmados pela ausência de deformações e malformações aos embriões, porém apresenta efeitos tóxicos a longo prazo. Lindeberg et al. (2013) compararam a genotoxicidade de células mesoteliais e células epiteliais brônquicas humanas após tratamento *in vitro* por 24, 48 e 72h com SWCNTs (nanotubos de camadas simples) e MWCNTs curtas e

purificadas (1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 e 250 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) e observaram que, ambos os nanomateriais levaram ao aumento nos danos no DNA da linha de células mesoteliais, enquanto que apenas SWCNTs induziu danos no DNA das células epiteliais, o que sugere uma maior sensibilidade da linha de células mesoteliais. No entanto, os autores recomendam cuidado na interpretação dos dados, visto que, os aumentos observados nos danos no DNA foram pequenos e alguns deles ocorreram em doses relativamente elevadas de CNT's.

O DMSO e a sacarose associados aos nanotubos apresentaram baixa toxicidade para os embriões de curimba. Lahnsteiner (2008) observou que o DMSO, comparado a outros crioprotetores (1,2-propanodiol, glicerol, etilenoglicol, metano e dimetilacetamida) foi menos tóxico para embriões de *D. rerio* durante 48 horas, e os crioprotetores externos sacarose e glicose foram menos tóxicos quando avaliados isoladamente.

Lahnsteiner (2008) também observou que os estágios ontogenéticos iniciais foram os que apresentaram maior sensibilidade aos crioprotetores, quando comparados a estágios avançados. Portanto, a fase de fechamento do blastóporo usada neste experimento pode ter contribuído para a resistência dos embriões a todos os crioprotetores. Para embriões de *Piaractus mesopotamicus*, a fase de fechamento de blastóporo foi adequada para sobrevivência de 69,2% dos embriões resfriados a -8°C com 17,1% sacarose e 9% metanol (STREIT JUNIOR et al., 2007). Outro fato importante que deve ser citado é que, devido à alta resistência dos embriões de *P. lineatus* aos crioprotetores, essa espécie

oferece um modelo de vertebrados útil para a avaliação toxicológica de compostos a serem testados.

A morfologia está diretamente relacionada com o volume do embrião e foi observado o efeito dos crioprotetores diretamente no volume dos mesmos para T1, T5 e T6, fazendo-nos concluir que o DMSO, a sacarose, e os NTC's apresentaram algum efeito crioprotetor para os embriões de curimba, provavelmente auxiliando a osmorregulação do embrião durante 15 minutos de exposição, que, entretanto não foi suficiente durante o congelamento para evitar a formação de gelo intracelular e possivelmente os embriões não puderam compensar o efeito do congelamento/descongelamento.

A análise morfométrica foi usada como parâmetro para avaliar a permeabilidade de embriões aos crioprotetores sendo que Lahnsteiner (2008) observou resultados semelhantes para *Danio rerio*, utilizando diversos crioprotetores, incluindo a sacarose e o DMSO, à temperatura de 27°C com alguns minutos de exposição. Lopes et al. (2011) observaram para *P. mesopotamicus* que a ação do crioprotetor está diretamente relacionada ao estágio de desenvolvimento e ao tempo de congelamento e concluíram que o controle da osmoregulação nos compartimentos do embrião é um dos fatores a ser considerado para melhorar a sobrevivência das larvas, durante o resfriamento.

Lahnsteiner (2008) observou que, para embriões de *D. rerio*, a altura da blástula e a espessura da gástrula diminuíram durante a exposição ao DMSO associado à sacarose e que poderia ser um indício de desidratação e sugerem também que o tecido germinativo reagiu de maneira diferente do vitelo, indicando que a desidratação do vitelo de

embriões de zebrafish é impossível com crioprotetores externos de rotina. Entretanto, os autores não mediram outras variáveis específicas de compartimentos embrionários.

O diâmetro do embrião (inclui tecido germinativo e o vitelo) apresentou diferença significativa, ao longo dos tempos de exposição, mostrando que os crioprotetores chegaram até a membrana do embrião. Entretanto, não foram suficientes para protegê-lo ao longo do tempo e/ou provavelmente não permearam por completo todo o embrião/vitelo;entretanto, não medimos compartimentos embrionários como a altura e espessura da gástrula. A diferença encontrada para CD entre os tratamentos que continham apenas DMSO e as maiores concentrações de NTCs associadas ao DMSO comprova que esses crioprotetores foram capazes de desidratar os embriões.

Apesar da baixa toxicidade apresentada pelos diferentes crioprotetores, nenhum embrião foi capaz de sobreviver pós-descongelamento. Entretanto, a porcentagem de embriões íntegros foi maior para a associação de NTCs (60mg/mL) com sacarose e DMSO e para sacarose utilizada sozinha.

Os embriões submetidos até 60 mg/mL de nanotubos quando associados ao DMSO e a SAC apresentaram maiores porcentagens de embriões íntegros, entretanto maiores concentrações foram tóxicas durante o congelamento e menores concentrações não foram capazes de proteger os embriões. Os nanotubos apresentam alta flexibilidade e resistência, não quebram e nem sofrem danos estruturais quando dobrados ou submetidos à alta pressão (ELETSKII, 2007; SALVETAT et al., 1999).

A sacarose também demonstrou suas propriedades positivas quando associada aos NTCs ou como crioprotetor isolado, sendo que outros autores também verificaram essas características. Woelders (1997) cita que as propriedades mecânicas dos meios que contêm açúcares, por exemplo, a sacarose é de contribuir para redução da tensão mecânica provocada pela rápida deformação estrutural das células sob altas taxas de resfriamento. Streit Junior et al. (2007) desenvolveram um protocolo para embriões de *P. mesopotamicus* a -8°C por, no mínimo, seis horas, contendo 9% de metanol e 17,1% de sacarose como soluções crioprotetoras.

Os nanotubos de carbono não são tóxicos aos embriões de curimba, quando associados ao DMSO e à sacarose, porém não foram suficientes para protegê-los, durante o congelamento e descongelamento. Contudo, foram capazes de penetrar os embriões dessa espécie e, provavelmente, devido a essa característica mantiveram boa porcentagem de embriões íntegros quando associados ao DMSO e à sacarose.

***Prochilodus lineatus* embryos cryopreserved with carbon nanotubes associated to dimethylsulfoxide and sucrose**

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate different cryoprotectants solutions and different exposure times on toxicity and cryopreservation of curimba (*Prochilodus lineatus*) embryos. Embryos were submitted to the treatments: T0: Distilled water; T1: Dimethyl sulfoxide (DMSO) 7.8%, T2: Carbon nanotubes (CNTs) 120 mg/mL, T3: Sucrose (SUC) 17.1%, T4: DMSO 8% + SUC 17.1% + CNTs 40 mg / mL; T5: DMSO 7.8% + SUC 17.1% + CNTs 60 mg/mL; T6: DMSO 7.8% + SUC 17.1% + CNTs 120 mg/ml, for 15, 60 and 105 minutes. We evaluated the percentage of larvae (normal living, malformed living and dead) and measured the total area of the embryo (TA), the average diameter of the corium (DC) and the average diameter of the embryo (DE). Embryos (n = 6) were fixed in order to evaluate its development and the presence of CNTs. After the treatments, embryos (n = 12) had the corium removed, conditioned in straws with the respective solutions and maintained in liquid nitrogen for 6 months. The straws were thawed at 36°C for 15" (TD1) and at 60°C for 6" (TD2), and the embryos evaluated regarding morphological integrity and development. The data were submitted to analysis of variance using the R computer package. We observed a smaller percentage of live larvae for T5 in the toxicity test ($P < 0.05$). There was interaction between solutions and exposure time for DC, being higher for T0, T2, T3 and T4 ($P < 0.05$) after 15 minutes of exposure. DE was lower at 15 minutes of exposure ($P < 0.05$). The embryos showed normal development and we identified the presence of NTC's in the different samples, with the exception to T0. The average percentage of intact embryos was higher for T3 in the TD2 and for T6 in TD1 ($P < 0.05$). The average percentage of intact embryos in TD1 was higher for T5 and lower for T0, and in TD2, higher for T3 and T5 and lower for T0 and T6 ($P < 0.05$). No embryo progressed in embryonic development post-thawing. The CNTs associated with DMSO and sucrose were not toxic to curimba embryos, but were not sufficient to protect them in freezing/thawing. However, CNTs penetrated embryos and maintained high percentage of intact embryos.

Keywords: Conservation. Cryoprotectants. Carbon Nanotubes. Fishes. Reproduction.

REFERÊNCIAS

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

CHENG, J. et al. Acute and long-term effects after single loading of functionalized multi-walled carbon nanotubes into zebrafish (*Danio rerio*). **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 235, n. 2, p. 216-225, Mar. 2009.

CHENG, J.; FLAHAUT, E.; CHENG, S. H. Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 26, n. 4, p. 708-716, Apr. 2007.

CUADRADO, E. E. H. et al. Extension of sperm motility leads to increased rates of fertilization and hatching in curimba, *Prochilodus lineatus*. **Journal of Applied Ichthyology**, Hamburg, v. 29, p. 1-5, June 2013.

DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, Woburn, v. 48, n. 5, p. 831-841, Oct. 1997.

ELETSKII, A. V. Mechanical properties of carbon nanostructures and related materials. **Physics-Uspekhi**, Sofia, v. 50, n. 3, p. 225-261, Aug. 2007.

FIRME, C. P.; BANDARU, P. R. Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, Philadelphia, v. 6, n. 2, p. 245-256, Apr. 2010.

FORNARI, D. C. et al. Freezing injuries in the embryos of *Piaractus mesopotamicus*. **Zygote**, Cambridge, v. 19, n. 4, p. 345-350, Nov. 2011.

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

HAGEDORN, M. et al. New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation. **Cryobiology**, San Diego, v. 34, n. 4, p. 335-347, June 1997.

HAGEDORN, M.; KLEINHANS, F. W. Problems and prospects in cryopreservation of fish embryos. In: TIERSCH, T. R.; GREEN, C. C. (Ed.). **Cryopreservation in aquatic species**. 2nd ed. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2011. p. 483-502.

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

LINDBERG, H. K. et al. Genotoxicity of short single-wall and multi-wall carbon nanotubes in human bronchial epithelial and mesothelial cells *in vitro*. **Toxicology**, Limerick, v. 313, n. 1, p. 24-37, Nov. 2013.

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. 570-576, Feb. 2011.

MARTINEZ, D. S. T.; ALVES, O. L.; BARBIERI, E. Carbon nanotubes enhanced the lead toxicity on the freshwater fish. **Journal of Physics: Conference Series**, Moscow, v. 429, n. 1, 2013. Disponível em: <<http://iopscience.iop.org/1742-6596/429/1/012043>>. Acesso em: 10 nov. 2013.

MURGAS, L. D. S. et al. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, n. 3, p. 526-531, jun. 2007.

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.

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

PATLOLLA, A.; KNIGHTEN, B.; TCHOUNWOU, P. Multi-walled carbon nanotubes induce cytotoxicity, genotoxicity and apoptosis in normal human dermal fibroblast cells. **Ethnicity & Disease**, Atlanta, v. 20, n. 1, p. 65-72, July 2010.

PUMERA, M. Graphene, carbon nanotubes and nanoparticles in cell metabolism. **Current Drug Metabolism**, Hilversum, v. 13, n. 3, p. 251-256, Mar. 2012.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 10 jun. 2013.

RALL, W. F. Recent advances in the cryopreservation of salmonid fishes. In: CLOUD, J. G.; THORGAARD, G. H. (Ed.). **Genetic conservation of salmonid fishes**. New York: Plenum, 1993. p. 137-158.

REIS, R. E.; KULLANDERS, S. O.; FERRARIS-JUNIOR, C. J. **Check list of the freshwater fishes os South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUC, 2003. 719 p.

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

SALVETAT, J. P. et al. Mechanical properties of carbon nanotubes. **Applied Physics A: Materials Science & Processing**, Berlin, v. 69, n. 3, p. 255-260, Sept. 1999.

STREIT JUNIOR, D. P. et al. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 8, p. 1119-1202, ago. 2007.

VIVEIROS, A. T. et al. A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba *Prochilodus lineatus* (Characiformes) semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 112, n. 3/4, p. 293-300, June 2009.

WOELDERS, H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. **Veterinary Quarterly**, Boston, v. 19, n. 3, p. 135-138, Sept. 1997.

ZHANG, L. W. et al. Biological interactions of functionalized single-wall carbon nanotubes in human epidermal keratinocytes. **International Journal of Toxicology**, Washington, v. 26, n. 2, p. 103-113, Mar. 2007.