

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CRIOPROTETORES NO RESFRIAMENTO E CONGELAÇÃO DE  
EMBRIÕES DE PACU (*Piaractus mesopotamicus*)

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

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Fevereiro-2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CRIOPROTETORES NO RESFRIAMENTO E  
CONGELAÇÃO DE EMBRIÕES DE PACU (*Piaractus  
mesopotamicus*)

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

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

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Fevereiro-2009

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

F727c      Fornari, Darci Carlos  
            Crioprotetores no resfriamento e congelação de  
            embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) / Darci  
            Carlos Fornari. -- Maringá : [s.n.], 2009.  
            51 f. : il. color.

            Orientador : Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro.  
            Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
            Maringá, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2009.

            1. Criopreservação. 2. Resfriamento de embriões. 3.  
            Biotecnologia. 4. Reprodução de peixes. 5. pacu  
            (*Piaractus mesopotamicus*). I. Universidade Estadual de  
            Maringá. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. II.  
            Título.

CDD 21.ed. 639.311



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**CRIOPROTETORES NO RESFRIAMENTO E  
CONGELAÇÃO DE EMBRIÕES DE PACU (*Piaractus  
mesopotamicus*)**

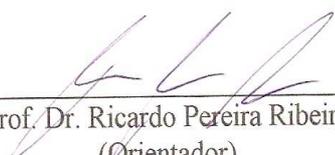
Autor: Darci Carlos Fornari  
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção  
Animal

APROVADA em 19 de fevereiro de 2009.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Fábio Luiz  
Bim Cavaliere

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro  
(Orientador)

**“Não faças do amanhã o sinônimo de nunca, nem o ontem te seja o mesmo que nunca mais. Teus passos ficaram. Olhes para trás... mas vá em frente, pois há muitos que precisam que chegues para poderem seguir-te.”**

*Charles Chaplin*

Aos

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

Aos

meus irmãos, Anderson, Alione e Nereide  
pelo incentivo, carinho, amizade,  
companheirismo e pelos lindos  
sobrinhos que colocaram em minha

vida

Ane Caroline, Kauan e Pedro

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

A grande amiga **Marcela Guelf Curioni**, uma pessoa especial, incentivadora dos meus desafios desde a graduação.

Aos *colegas e amigos* do grupo PeixeGen, **Alexandra, Luiz Alexandre, Ana Cláudia, Dany Tais, Melanie, Juliana, Sheila, Fernanda, Thiago, Patrícia, Nelson e Jayme** pelos bons momentos de bate-papo, troca de conhecimentos e auxílio na parte de campo deste trabalho.

Aos meus amigos de república **Fabio Cortes e Rodrigo de Souza**, pela fiel amizade e companheirismo.

Aos amigos do grupo de pesquisa *Aquam/UFRGS* **André, Cassiano, Diego, Karina, Raquel, Luiz, Maira, e Professora Silvia** pela grande amizade e auxílio nas análises de laboratório de microscopia eletrônica.

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

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

Aos Funcionários da Falm, **Edmilson Pelisar, João Carlos, Jeferson Jusip e Prof. Sandremir.**

À Universidade Estadual de Maringá (UEM)

À Duke Energy International e a Falm-UENP por ceder a estrutura e pelo apoio ao projeto.

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

Aos funcionários do PPZ e do DZO.

A Capes (coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida.

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

***Muito Obrigado a Todos!!!***

## **BIOGRAFIA**

DARCI CARLOS FORNARI, filho de Dalci Fornari e Ibraina Fornari. Nasceu no município de Ubitatã, Estado do Paraná, aos 23 dias do mês de abril de 1978.

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

Em março de 2007, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de mestrado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Piscicultura.

No dia 19 de fevereiro de 2009, submeteu-se à banca para defesa da Dissertação.

## ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
I.    INTRODUÇÃO GERAL.....	5
II.   REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1.Espécie: <i>Piaractus mesopotamicus</i> (Holmberg, 1887) “pacu”.....	7
2.2. Embriões de <i>P. mesopotamicus</i> .....	8
2.3. Agentes crioprotetores.....	9
2.4. Sensibilidade dos embriões de peixes a temperaturas próximas ou abaixo de 0°C.....	12
2.5. Congelação de embriões.....	14
2.6. Resfriamento e criopreservação em espécies sul-americanas.....	16
2.7. Referências.....	17
III. OBJETIVOS GERAIS.....	22
IV. EMBRIÕES DE PACU RESFRIADOS COM SACAROSE ASSOCIADA AO METANOL EM DIFERENTES TEMPOS DE ESTOCAGEM.....	23
Abstract.....	23
Introdução.....	24
Material e Métodos.....	25
Resultados e Discussão.....	29
Conclusão.....	33
Referências.....	34
TABELAS E FIGURAS.....	36
V. CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE.....	38
Abstract.....	38
Introdução.....	38
Material e Métodos.....	40
Resultados e Discussão.....	44
Conclusão.....	49
Referências.....	49

## LISTA DE TABELAS

		Página
IV. EMBRIÕES DE PACU RESFRIADOS COM SACAROSE ASSOCIADA AO METANOL EM DIFERENTES TEMPOS DE ESTOCAGEM.....		23
Tabela 1.	Composição das soluções crioprotetoras usadas no resfriamento de embriões de pacu ( <i>P. mesopotamicus</i> ) à -8°C, em quatro tempos de estocagem.....	27
Tabela 2.	Viabilidade de larvas de <i>P. mesopotamicus</i> após seis horas de resfriamento a -8°C, utilizando diferentes crioprotetores.....	46
Tabela 3	Viabilidade de larvas de <i>P. mesopotamicus</i> após 12 horas de resfriamento a -8°C, utilizando diferentes crioprotetores.....	46
Tabela 4	Viabilidade de larvas de <i>P. mesopotamicus</i> após 24 horas de resfriamento a -8°C, utilizando diferentes crioprotetores.....	46
V. CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE.....		38
Tabela 1	Composição das soluções crioprotetoras usadas na congelação de embriões de pacu ( <i>P. mesopotamicus</i> ).....	42

## LISTA DE FIGURAS

	Página
IV. EMBRIÕES DE PACU RESFRIADOS COM SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS DE SACAROSE E METANOL EM DIFERENTES TEMPOS DE ESTOCAGEM.....	23
Figura 1 A -estádio de 75% de epibolia (fechamento do blastóporo); B- ovo gorado; C- Larva viva nadando. Imagens obtidas através de um estereomicroscópio com auxílio de uma câmera digital 7,2 mega pixels (40X).....	26
Figura 2 Médias de eclodibilidade de larvas de <i>P. mesopotamicus</i> submetidos ao resfriamento a -8°C em diferentes tempos de estocagem, com solução crioprotetora 9% de metanol associado a diferentes concentrações de sacarose.* taxa de eclosão controle, sem resfriamento e sem crioprotetor.....	37
V. CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE PACU UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE.....	38
Figura 1 Imagem de embrião de <i>P. mesopotamicus</i> , no estágio de pós-gastrulação, 95% de epibolia na fase do fechamento do blastóporo (esteromeicroscópio, 40X).....	44
Figura 2 Eletromicroscopia de varredura de embriões de pacu ( <i>P. mesopotamicus</i> ) após congelação e descongelação sem crioprotetor; A1 – blastoderme com células danificadas; A2 – embrião com vitelo desconfigurado e blastoderme totalmente danificada; A3 – embrião com vitelo destruído e blastoderme danificada.....	47
Figura 3 Eletromicroscopia de varredura de embriões de pacu ( <i>P. mesopotamicus</i> ) após congelação e descongelação utilizando solução crioprotetora contendo 8,50% de sacarose associada a 9% de metanol; A1 – blastoderme com células danificadas e vitelo desconfigurado; A2 – células embrionárias; A3 – micrósporo do córion, danificado provavelmente pelo influxo e efluxo do crioprotetor e água.....	47
Figura 4 Eletromicroscopia de varredura de embriões de pacu ( <i>P. mesopotamicus</i> ) após congelação e descongelação utilizando solução crioprotetora contendo 17% de sacarose associada a 9% de metanol; A1 – embrião com vitelo aparentemente intacto e blastoderme danificada; A2 – embrião hidratado com córion intacto; A3 – camada sincicial do vitelo aparentemente danificada.....	48
Figura 5 Eletromicrografia de varredura de embriões de pacu ( <i>P. mesopotamicus</i> ) após congelação e descongelação utilizando solução crioprotetora contendo 25,6% de sacarose associada a 9% de metanol; A 1 – embrião com blastoderme danificado e córion destruído; A 2 – vitelo desconfigurado, com blastoderme destruído; A 3 – camada sincicial do vitelo aparentemente danificada.....	48

Figura 6 Eletromicrografia de varredura de embriões de pacu (*P. mesopotamicus*) após congelação e descongelação, utilizando solução crioprotetora contendo 34,2 % de sacarose associada a 9% de metanol; A 1 – células blastoderme destruídas; A 2 – vitelo destruído, presença de pequenas partes do blastoderme; A 3 – vitelo totalmente destruído, com presença de grânulos de extravasado.....

## RESUMO

O estudo foi realizado com objetivo de testar diferentes concentrações de sacarose associada ao metanol a fim de prolongar o tempo de estocagem dos embriões pelo resfriamento e desenvolver um protocolo de congelação que permita armazenar embriões de peixes por tempo indeterminado. Para o resfriamento, os embriões foram submetidos às concentrações de sacarose de 8,5%, 17,0%, 25,5% e 34,0%, associadas a 9% de metanol e mais um controle somente com água. Para cada tratamento, foram avaliados os tempos de estocagem de 6h, 12h, 24h e 48 horas. Não houve diferença estatística entre os tratamentos com 17%, 25,5% e 34% de sacarose quando o tempo de estocagem foi de seis horas. No tempo de estocagem de 12 horas, verificou-se menor percentagem de eclosão em todos os tratamentos. Verificando o pior resultado para a maior concentração de sacarose utilizada (34%). O tempo de 24 horas de estocagem a -8°C permitiu sobrevivência de embriões apenas no tratamento com 8,5% de sacarose associada a 9% de metanol. No entanto, quando se prolonga para 48 horas não se observa eclosão. Para congelação foram testadas soluções com 0,25, 0,50, 0,75 e 1,00 M de sacarose associadas a 9% de metanol e mais um controle (somente água). Para submeter à queda gradual de temperatura utilizou-se um aparelho de resfriamento “BIOCOM” com curva de congelação programável de 0,5°C/min, e armazenados em nitrogênio líquido quando a temperatura atingiu -33°C. Apesar de apresentarem boa hidratação após a descongelação, não se observou eclosão. Os embriões foram descongelados para avaliação da taxa de eclosão. Em todos os tratamentos foram coletadas amostras para análise em eletromicrografia de varredura. Através da eletromicrografia de varredura pode se observar algumas alterações morfológicas. O tratamento com menores danos morfológicos nos embriões após a descongelação foi com 17% de sacarose associada a 9% de metanol. Com base nos resultados concluímos que é necessário a utilização de crioprotetores para manter a viabilidade de

embriões estocados a  $-8^{\circ}\text{C}$ . Para seis horas de estocagem sugere-se utilizar concentrações de 17%, 25,5% ou 34% de sacarose associado a 9% de metanol. Quando o tempo de estocagem for 12 horas sugere-se utilizar 8,5%, 17% ou 25,5% de sacarose associado a 9% de metanol. Para 24 horas de estocagem, sugere-se a utilização de 8,5% de sacarose associada a 9% de metanol. Os protocolos de congelação testados não evitaram a formação de cristais de gelo, conseqüentemente às deformações embrionárias, inviabilizando os embriões de *P. mesopotamicus*. Porém há indícios de que o tratamento com 17% de sacarose associada a 9% de metanol causou as menores alterações estruturais aos embriões submetidos a congelação, o que pode ser um fato muito promissor para novos estudos.

**Palavras-chave:** biotecnologia, metanol, preservação, reprodução, sacarose.

## ABSTRACT

The study was carried out with objective of testing different sucrose concentrations associated to the methanol in order to prolong the storage time of the embryos by cooling and to develop a freezing protocol to allow storing embryos of fish for uncertain time. For cooling, the embryos were submitted to the concentrations of sucrose of 8.5%, 17.0%, 25.5% and 34.0%, associated to 9% of methanol and one more control containing only water. For each treatment, there were evaluated the storage times of 6, 12, 24 and 48 hours. There were no statistical difference among the treatments with 17%, 25.5% and 34% of sucrose when the storage time was of six hours. In the storage time of 12 hours, a lower hatching percentage was verified in all treatments. It was observed the worst result for the largest concentration of used sucrose (34%). The storage time of 24 hours at  $-8^{\circ}\text{C}$  allowed the embryos survival just for treatment with 8.5% of sucrose associated to 9% of methanol. However, when it is prolonged for 48 hours the hatching was not observed. The freezing solutions were tested with 0.25, 0.50, 0.75 and 1.00 M of sucrose associated to 9% of methanol and one more control (only water). To submit to the gradual fall of temperature the cooling equipment "BIOCOM" was used with programmable freezing curve of  $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , and stored in liquid nitrogen when the temperature reached  $-33^{\circ}\text{C}$ . In spite of had a good hydration after the thawing, the hatching was not observed. The embryos were thawed for evaluation of the hatching tax. In all treatments samples were collected for scanning electron microscopy analyzes. Through the scanning electron microscopy analyzes it is possible to observe some morphologic alterations. The treatment with lower morphologic damages in the embryos after the thawing was with 17% of sucrose associated to 9% of methanol. Based in the results it is concluded that it is necessary the cryoprotectans use to maintain the embryos viability storage at  $-8^{\circ}\text{C}$ . For six hours of storage it is suggested to use concentrations of 17%, 25.5% or 34% of sucrose associated to 9% of methanol. When the storage time goes to 12 hours it is suggested the use

of 8.5%, 17% or 25.5% of sucrose associated to 9% of methanol. For 24 hours of storage it is suggested the use of 8.5% of sucrose associated to 9% of methanol. The freezing protocols tested didn't avoid the formation of ice crystals, consequently to the embryonic deformations, making unfeasible for the embryos of *P. mesopotamicus*. However there are indications that the treatment with 17% of sucrose associated to 9% of methanol caused the smallest structural alterations to the embryos submitted to freezing processing, what can be a very promising fact for new studies.

**Key-words:** biotechnology, methanol, preservation, reproduction, sucrose.

## 1. Introdução geral

As perdas ambientais e de oportunidade de mercado na piscicultura com o desaparecimento de espécies são imensuráveis. Todavia, o desenvolvimento de biotécnicas de resfriamento e criopreservação de embriões de peixes podem contornar esse impacto ambiental negativo. Gametas colhidos em programas de reprodução de populações silvestres ou de cativeiro podem ser utilizados para a conservação de recursos genéticos e na condução de estudos de melhoramento animal, podendo ser preservados por curto ou longo tempo (Gwo, 2000; Gorman, 2000).

O que torna pertinente a observação feita por Harvey (2000), recomendando a criação de bancos genéticos que possam assegurar a disponibilidade futura do material conservado, tanto para aplicação ambiental como para produção zootécnica, amenizando as perdas de variabilidade genética de uma população, podendo, ainda, contribuir para programas de melhoramento genético.

A conservação de embriões envolve uma série de processos físico-químicos complexos, como: variação de temperatura (curva de resfriamento), osmolaridade da solução, permeabilidade dos crioprotetores nas células ou compartimentos do embrião e toxicidade dos reagentes (Bart, 2000). Em peixes, a conservação de células pequenas, como o espermatozóide, é fácil e regularmente realizada com sucesso em muitos laboratórios (Hagerdorn et al., 1997a; Strüssmann et al., 1999; Bart, 2000). No entanto, a congelação de embriões de peixes ainda não foi solucionada, devido a alguns fatores: (i) tamanho do ovo, resultando em uma diminuta razão entre a superfície e o volume, podendo retardar o fluxo/influxo da água e do crioprotetor; (ii) grande tamanho das células, como o vitelo, que pode ser facilmente rompido durante a congelação; (iii) compartimentalização entre a lastoderme e o vitelo, que possuem diferentes propriedades de permeabilidade; (iv)

membranas semipermeáveis como o córion, que podem dificultar a entrada e saída de água e crioprotetor; (v) potencial de suscetibilidade do embrião a danos pelo resfriamento (Harvey, 1983; Stoss, 1983; Zhang & Rawson, 1995; Hagerdorn et al., 1997a; Ninhaus-Silveira et al., 2007).

Apesar da dificuldade até o presente momento em se obter sucesso na congelação de embriões de peixes (Hagedorn et al., 2004; Zhang et al., 2005), a técnica de resfriamento de embriões tem sido demonstrada como uma alternativa viável (Ahammad et al., 2002). Para *P. mesopotamicus*, Streit Jr. et al. (2007), estabeleceram um protocolo de resfriamento que permite estocar embriões por seis horas a  $-8^{\circ}\text{C}$ . Dentre as possíveis aplicações do resfriamento de embriões, pode-se destacar, a otimização do uso de incubadoras e a logística, evitando transporte de grande volume de água e cilindros de oxigênio durante a comercialização. Além disso, Ahammad et al. (2003) afirmaram que é possível a colheita de embriões em lugares remotos, mantendo-os refrigerados durante o transporte até o local em que estes possam ser incubados com segurança. Com isso, essa biotecnologia poderia ser utilizada no salvamento de desovas ameaçadas por agentes poluidores em casos de desastres ecológicos. E ainda, resultados da resistência do embrião a baixas temperaturas poderão contribuir para estudos do protocolo de congelação.

Para submeter embriões a baixas temperaturas é indispensável o uso de crioprotetores (Harvey, 1983). Os crioprotetores são classificados de acordo com sua ação, sendo os intracelulares: metanol, etilenoglicol e DMSO (Reichenbach et al., 2001). Entre estes, no processo de resfriamento de embriões de espécies nativas brasileiras, o metanol vem apresentando excelentes resultados (Streit Jr. et al., 2007), sendo este potencializado quando associado com um crioprotetor extracelular (Denniston et al., 2000). Os crioprotetores extracelulares mais utilizados são: sacarose, glicose e trealose (Niemann, 1991; Denniston et al., 2000).

Portanto, tornam-se necessários estudos que possam contribuir para estabelecer um protocolo de resfriamento ou congelação, que permita preservar espécies ameaçadas de extinção, além de contribuir para programas de melhoramento genético.

## 2. Revisão de Literatura

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

O pacu (*P. mesopotamicus*) é um peixe da ordem Characiformes, família Characidae e subfamília Myleinae (Nakatani et al., 2001). Esta espécie originária da bacia do Prata, especificamente dos rios Paraná-Paraguai e seus afluentes (Castagnolli & Zuim, 1985). Em ambientes naturais sua coloração é quase preta, passando para amarelo brilhante quando está na cabeceira dos rios para efetuar a desova (Britski, 1999). O período reprodutivo dessa espécie estende-se de novembro a janeiro, com desova total, fecundação externa e grandes migrações reprodutivas a fim de liberar seus gametas (Romagosa et al., 1988). Por ser uma espécie de piracema, em ambiente confinado depende da indução hormonal para obter sucesso na sua reprodução (Lima et al., 1991; Urbinati & Gonçalves, 2005).

Das espécies sul-americanas cultivadas no Brasil o *P. mesopotamicus* caracteriza-se como uma das principais, devido às excelentes características zootécnicas para o cultivo e grande aceitação na piscicultura e mercado consumidor brasileiro (Urbinati & Gonsalves, 2005). Observando as qualidades do *P. mesopotamicus*, em meados dos anos setenta, pesquisadores começaram a trabalhar com esta espécie a fim de desenvolver um pacote tecnológico para seu cultivo. Desde então, diversos trabalhos foram e vêm sendo desenvolvidos a fim de viabilizar a sua produção em larga escala (Castagnolli & Zuim, 1985; Lima et al., 1991; Silva et al., 1997; Bock & Padovani, 2000; Streit et al., 2006).

## 2.2) Embriões do *P. mesopotamicus*

Espécies reofílicas brasileiras, como o *P. mesopotamicus* eliminam seus gametas no corpo d'água, onde ocorre a fecundação e seu desenvolvimento, mecanismo reprodutivo conhecido como ovuliparidade (Vazoller, 1996; Graças & Pavanelli, 2007).

O processo embrionário inicia-se com a fecundação do óvulo pelo espermatozoide, via micrópila, após a fertilização, o ovo absorve água e ocorre a formação do espaço perivitelino, com a separação do córion da membrana vitelina (Nakatani et al., 2001). Diferente do que ocorre em mamíferos, em que o embrião é implantado no útero e se desenvolve a partir de nutrientes fornecidos pela mãe, nos peixes, os nutrientes estão contidos em um ovo (vitelo) e são suficientes para iniciar o desenvolvimento do embrião (Brooks et al., 1997).

Os ovos de *P. mesopotamicus* recém-fecundados apresentam diâmetro médio de 2,69 mm e espaço perivitelino amplo (25 a 41%), com tamanho médio de 1,41 mm. Já o diâmetro médio do vitelo é de 0,60 mm (Nakatani et al., 2001)

O desenvolvimento embrionário do *P. mesopotamicus* verificado por Ribeiro et al. (1995) ocorre como o descrito resumidamente por Nakatani et al. (2001):

- blastodisco formado por uma célula, sendo que a separação deste se dá logo após a fecundação;

- segmentação, caracterizado por clivagens sucessivas do blastodisco, em 2,4, 8, 16 e, assim sucessivamente, dando origem aos blastômeros;

- blastulação, fase em que o blastodisco apresenta-se estratificado e alto, com pequenas cavidades entre os blastômeros e a presença de uma lâmina sincicial perivitelínica;

- gastrulação, que caracteriza-se, quando as células do blastodisco deslocam-se e separam-se em epiblasto (futuro folheto externo) e hipablasto (notocorda, meso e endoderme), assim o epiblasto e a lâmina sincicial perivitelínica expandem-se como um manto que

recobre, inicialmente, metade do vitelo, para em seguida  $\frac{3}{4}$  e, finalmente, fecha-se o blastóporo. Então, o corpo do embrião alonga-se, ficando sua extremidade caudal voltada para o blastóporo;

- fechamento do blastóporo, em que ocorre havendo recobrimento de três regiões do vitelo: zona embriogênica (corpo de embrião, exceto cauda), bordas de fechamento (porção caudal) e parede do saco vitelino. Nesta fase podem ser visualizados os primeiros somitos;

- vesícula óptica, que fica evidente após o fechamento do blastóporo, como expansão lateral do prosencéfalo;

- vesícula auditiva, que se identifica com o aparecimento dos otólitos, além de ser possível neste estágio verificar os somitos;

- liberação da cauda, em que a cauda destaca-se do saco vitelino;

- eclosão, que ocorre através de contrações musculares vigorosas da cauda e do corpo, além do amolecimento do córion como resultado da ação de enzimas. Após a eclosão, o embrião torna-se muito ativo, sendo que o grau de diferenciação da larva recém-eclodida depende da espécie considerada.

### **2.3) Agentes crioprotetores**

Agentes crioprotetores são essencialmente importantes para a criopreservação de células, pois na ausência de crioprotetores ocorre a formação de cristais de gelo, considerado letal para as células (Polge, 1949; Denniston et al., 2000; Leibo, 2000). Por outro lado, apesar de necessário, a toxidez destes agentes pode provocar mortalidade de células durante a sua penetração ou saída do interior das células (Chao & Liao, 2001). Os motivos dos crioprotetores promoverem injúrias nas células podem ser de origem osmótica, bioquímica ou físico-química (Fahy, 1983). Então, a mudança abrupta do volume celular, resultante da rápida introdução e remoção do crioprotetor, pode acarretar injúrias ou danos osmóticos

(Renard et al., 1989). Já, Robertson et al. (1988) sugeriram também como choque osmótico a modificação na permeabilidade da membrana celular o que causariam um efeito tóxico indireto. A desnaturação celular, considerada uma toxidez bioquímica, pode ser gerada em resposta à interação entre o crioprotetor e as enzimas celulares (Arnold et al., 1983; Fink, 1986).

Os crioprotetores são classificados de acordo com a forma que agem nas células. Moléculas com baixo peso molecular como glicerol, dimetil-sulfóxido (DMSO), propileno-glicol, etileno-glicol e metanol, são conhecidos como agentes crioprotetores intracelulares, pois atravessam as membranas celulares com relativa facilidade. Por outro lado, moléculas com peso molecular alto e que, portanto, não permeiam as células, como sacarose, glicose, lactose, polivinilpirrolidona (PVP), rafinose, manitol, entre outros, são considerados crioprotetores extracelulares (Niemann, 1991; Denniston et al., 2000).

Dentre os crioprotetores intracelulares, o metanol vem apresentando resultados satisfatórios. Em embriões de *P. mesopotamicus*, a associação de 9% de metanol com 17% de sacarose na solução crioprotetora permitiu a sobrevivência de 69,2% de embriões após resfriamento a -8°C (Streit Jr. et al., 2007). Em embriões de “red drum” (*Sciaenops ocellatus*), Robertson et al. (1988) testaram glicerol, DMSO, etileno-glicol, metanol, sacarose e sal marinho e observaram que o metanol e o DMSO apresentaram menor toxidez para a espécie que os outros crioprotetores testados. Porém, para algumas espécies como em embriões de “turbot” (*Scophthalmus maximus*), o DMSO foi menos tóxico que o metanol e o etileno-glicol como verificaram Cabrita et al. (2003). A ação tóxica do crioprotetor também pode estar relacionada com as fases do desenvolvimento do embrião, como demonstraram Dinnyés et al. (1998) com carpa (*Cyprinus carpio*), em estádios de mórula e segmentação, o DMSO foi menos tóxico que o metanol, por outro lado, quando os embriões de carpa apresentavam o coração batendo, o metanol foi menos tóxico.

Com embriões de “zebrafish” (*Brachydanio rerio*), Zhang & Rawson (1995) mostraram que a 0°C, o metanol à concentração de 1,0 M foi mais eficiente em mantê-los viáveis por 18 horas (sobrevivência de 78%) do que a 2,0 M. Entretanto, quando a temperatura passou a -5°C, com o mesmo tempo de manutenção, a concentração de 2,0 M manteve 95% dos embriões viáveis, enquanto na concentração de 1,0 M, foi de 33,3%.

O desempenho dos agentes crioprotetores intracelulares pode ser otimizado associando-os a crioprotetores de ação extracelular (Holt, 2000). Para Denniston et al. (2000) crioprotetores extracelulares como a sacarose, aumentam a concentração extracelular do soluto, provocando um fechamento das células embrionárias para água extracelular.

A sacarose apresenta-se como um potencial crioprotetor extracelular, principalmente, em função de suas propriedades estruturais. Segundo Woelders (1997), essa afirmativa está relacionada à contribuição desse açúcar na estabilidade da membrana celular, principalmente, quando se refere à deformação mecânica provocada por efluxo de água e o influxo de crioprotetor intracelular. Açúcares apresentam forte influência na manutenção da pressão osmótica. E ainda quando a membrana, composta de camadas fosfolipídica, é exposta a baixa temperatura, a molécula de açúcar, em especial a sacarose, pode promover uma proteção adicional contra ação do resfriamento Holt (2000). Este efeito osmótico significativo exercido pela sacarose provoca uma proteção à desidratação demasiada na pré-congelação (Zhang & Rawson, 1995), deste modo, reduzindo a toxidez dos crioprotetores intracelular (Ahammad et al., 2003).

Alguns trabalhos vêm destacando o uso de metanol associado à sacarose, mostrando ser a melhor solução crioprotetora para embriões de zebrafish e pacu (*B. rerio* e *P. mesopotamicus*) expostos a baixas temperaturas (Zhang & Rawson, 1995; Streit Jr. et al., 2007), apresentando baixa toxidez e eficiência na proteção da integridade dos embriões.

Com embriões de carpa comum, Ahammad et al. (2003) detectaram que a concentração ideal do crioprotetor extracelular, no caso sacarose, deve ser de 0,5 M, quando associado ao metanol, pois, em concentrações mais elevadas de sacarose, provoca ruptura do vitelo resultando em mortalidade total.

#### **2.4) Sensibilidade dos embriões de peixes a temperaturas próximas ou abaixo de 0°C**

É fato que um dos principais fatores que dificultam a congelação de embriões de peixes é a sua alta sensibilidade ao frio (Stoss, 1983). Em função disso, inúmeros estudos foram desenvolvidos para observar, em diferentes espécies, os danos causados aos embriões, quando submetidos a baixas temperaturas (Zhang & Rawson, 1995; Dinnyés et al., 1998; Calvi & Maisse, 1998; Liu et al., 2001).

A simples redução na temperatura da água de incubação pode ser suficiente para atingir o objetivo de prolongar o tempo de incubação dos embriões de peixes, como no estudo de Stonecypher Jr. et al. (1994) que observaram em diferentes espécies de trutas (*Salmo trutta*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus clarki*) a redução da temperatura de 7°C para 4°C, possibilitou dobrar o tempo de incubação dos embriões, passando de um para dois meses. Todavia, estes autores também constataram uma mortalidade elevada de embriões.

A utilização de soluções que permitam proteger as células embrionárias de peixes a baixas temperaturas passa a ser quase indispensável. Em embriões de *C. carpio*, Dinnyés et al. (1998) mostraram que quando expostos, durante uma hora, a temperatura de 0°C e 4°C, sempre apresentaram maiores médias de sobrevivência, quando submetidos ao crioprotetor; glicerol e em seguida o metanol e o DMSO. Em embriões de *B. rerio*, Zhang & Rawson (1995) observaram quando submetidos à temperatura de 0°C e no estágio com coração batendo, mostraram maior resistência ao resfriamento do que os embriões em estádios de três,

sete, 10, 15, 20 e 25 horas de incubação, utilizando metanol associado com sacarose. No entanto, para *P. mesopotamicus* a fase de fechamento do blastóporo parece ser a mais apropriada, evidenciado por Streit Jr. et al. (2007).

A sensibilidade dos embriões de peixes a baixas temperaturas pode estar relacionada aos fatores fisio-morfológicos. Um destes fatores pode ser a água intracelular, em especial a localizada no vitelo e, que, portanto, dificulta o processo de resfriamento e congelação lenta (Zhang & Rawson, 1995). Embriões de *Danio rerio* foram utilizados por Hagedorn et al. (1997a) como modelo de estudo. Os pesquisadores constataram que na reserva lipídica foi encontrado 42% do volume de água, entremeada aos lipídeos. Para Hagedorn et al. (1997b) a retirada desta água é fundamental para que o embrião seja mais resistente à exposição ao frio.

O mecanismo que gera injúrias nos embriões de peixes pode ser dividido em dois grupos, de acordo com Isayeva et al. (2004): o primeiro grupo é o que pode ser observado em qualquer tipo de célula que inclui mudança no metabolismo geral das células, ruptura de membranas, desbalanceamento do íon cálcio, dentre outros; Já, o segundo grupo caracteriza-se por danos específicos na formação dos ovócitos, como em anfíbios onde o resfriamento causa redução e outras mudanças na síntese de proteínas. Por outro lado, as injúrias causadas pela baixa temperatura, de acordo com Morris & Watson (1984) também podem ser classificadas em duas categorias: (a) as decorrentes diretamente do resfriamento ou pelo choque frio, em consequência do rápido resfriamento; (b) e as injúrias causadas indiretamente e independentes da taxa de resfriamento são as que irão manifestar após períodos extensos em baixas temperaturas. Em *D. rerio*, Liu et al. (2001) puderam constatar estes tipos de fenômenos. Os pesquisadores citados observaram que após a retirada de parte do vitelo, em estádios de desenvolvimento de 64 células, as injúrias nos blastômeros ocorreram em decorrência do tempo de exposição a baixa temperatura. Já em estágio de 50% de blástula até

o aparecimento de três somitos, foi uma combinação dos fatores do rápido resfriamento e ao tempo de exposição a baixa temperatura.

De acordo com Mazur (1977), ao submeter uma suspensão celular contendo crioprotetores à temperatura ao redor de  $-5^{\circ}\text{C}$ , tanto as células como o meio circundante provoca o abaixamento do ponto de solidificação da solução, isso ocorre pela adição de substância crioprotetoras à suspensão celular. O autor ainda atribuiu que a temperatura entre  $-5$  e  $-15^{\circ}\text{C}$ , normalmente, ocorre a formação de gelo no meio extracelular, mas as células continuam descongeladas e super resfriadas, provavelmente, porque a membrana plasmática impede o crescimento de cristais de gelo em direção ao meio extracelular. Estas observações são importantes quando se utiliza método de congelação lenta e o procedimento de “seeding” torna o meio vítreo, evitando que ocorra uma “pressão” sobre as células do embrião (Reichenbach et al., 2001).

## **2.5) Congelação de embriões**

A congelação consiste em manter o metabolismo celular em estágio de quiescência, tornando possível a conservação de células e tecidos por tempo indeterminado (Neves, 2008).

Baseados nos trabalhos desenvolvidos por Polge (1949) com sêmen de frango, surgiram os primeiros relatos com embriões de camundongos na década de 70 (Whittingham et al., 1972; Wilmut, 1972). Esses autores concluíram que, uma congelação celular só poderia ser feita através de uma curva lenta de congelação.

Nos últimos anos, vários métodos de congelação de embriões bovinos se baseiam numa curva de congelação padrão desenvolvido por Willadsen et al. (1976, 1978). Esses trabalhos correlacionam à queda de temperatura em função do tempo, obtido com velocidade de  $3^{\circ}\text{C}$  a  $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ , e a indução à cristalização da solução crioprotetora “seeding” na

temperatura de  $-7^{\circ}\text{C}$ , com prosseguimento da queda de temperatura até  $-33^{\circ}\text{C}$  a  $-35^{\circ}\text{C}$ , e posteriormente armazenado em nitrogênio líquido.

Quando a temperatura chega ao redor de  $-7^{\circ}\text{C}$  torna-se necessário o procedimento de “seeding”, processo que evita o risco de ultrapassar o ponto de solidificação da solução utilizada, ocorrência que determina um sub-resfriamento do sistema de congelação. Esse sub-resfriamento da solução pode persistir até aproximadamente  $-21^{\circ}\text{C}$ , temperatura ao redor da qual ocorre a cristalização do meio de forma espontânea. Se a cristalização do meio ocorrer em temperaturas inferiores ao seu ponto de solidificação (Mazur, 1977), passa a existir uma liberação de energia sob forma de calor e uma elevação da temperatura do sistema até próximo da temperatura do ponto solidificação da solução (Reichenbach et al., 2001). Em seguida, a temperatura é novamente reduzida de modo bastante rápido até atingir o equilíbrio térmico com a temperatura anterior. Esse sub-resfriamento causa alterações estruturais da membrana celular com consequentes distúrbios na permeabilidade hídrica (Whittingham, 1977). Devido a esses distúrbios, as células não conseguem desidratar suficientemente até o momento da temperatura de imersão no nitrogênio líquido. Para evitar esses fenômenos de sub-resfriamento, induz-se, artificialmente, a cristalização do meio extracelular, durante a congelação, numa temperatura ao redor de  $-7^{\circ}\text{C}$  (seeding). Essa indução é, geralmente, efetuada de modo mecânico, com auxílio de algum instrumento, como uma pinça previamente resfriada em nitrogênio líquido (Reichenbach et al., 2001).

Evidentemente, pequenos detalhes poderão ser o diferencial na tentativa de se estabelecer a biotecnologia da criopreservação em embriões de peixes. Enquanto as técnicas para criopreservação de embriões de mamíferos têm apresentado resultados consistentes, ainda existem problemas técnicos na congelação do genoma materno e de embrião em peixes (Ahammad et al., 1998).

## 2.6) Resfriamento e criopreservação em espécies sul-americanas

Pesquisas relacionadas a resfriamento e criopreservação de embriões desenvolvidas no Brasil são recentes (Streit Jr. et al., 2007). Alguns estudos estão relacionados ao conhecimento do potencial tóxico dos crioprotetores nas espécies nativas (Streit Jr., 2005). Por exemplo, Ninhaus-Silveira (2004) obtiveram 0% de taxa de eclosão de embriões de curimatá (*Prochilodus lineatus*), após tê-los submetidos aos crioprotetores etileno e propileno glicol monometil éter, metanol, DMSO e propileno glicol durante 1, 5 e 15 minutos e, em seguida, congelados por 24 horas em nitrogênio líquido, pelo método lento de congelação. Com embriões de piracanjuba (*Brycon orbygnianus*), Silva et al. (2006) constaram que a concentração de 2,0 molar de DMSO durante dez minutos não é tóxica, diferente das outras concentrações testadas de 4,0, 6,0 e 8,0 molar. Nos testes com crioprotetor realizado por Streit Jr. (2005) observaram toxidez maior quando utilizaram o DMSO em relação ao glicerol.

O protocolo de resfriamento para as espécies nativas sul-americanas foi sugerido por Streit Jr. et al. (2007) com embriões de pacu (*P. mesopotamicus*), em que foram testados diferentes combinações de crioprotetores intracelulares combinados com extracelulares no resfriamento dos embriões a  $-8^{\circ}\text{C}$ , estocados por seis horas. Os autores recomendaram a utilização de 17,1% de sacarose + 9% de metanol como solução a ser utilizada para este protocolo de resfriamento de embriões de *P. mesopotamicus*. Trabalhando com diferentes soluções crioprotetoras em embriões de cascudo preto (*Rhinelepis aspera*), Fornari et al. (2008), verificaram mais de 50% de eclosão de larvas após resfriamento por seis horas, utilizando metanol e sacarose como crioprotetores.

Experimento de criopreservação de embriões com *P. mesopotamicus* foi realizado por Neves (2008), submetendo embriões em diferentes tratamentos a uma curva de congelação de  $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ , estabilizando a curva em  $-33^{\circ}\text{C}$  e armazenado em nitrogênio líquido. Todavia,

este protocolo resultou em 100% de embriões com injúrias, não sendo recomendado para espécie estudada. Ninhaus-Silveira et al. (2008) testaram dois métodos de congelação e verificaram alterações morfológicas graves, inviabilizando os embriões de *P. lineatus* submetidos aos tratamentos. Esses autores sugerem novos estudos para o desenvolvimento da técnica de criopreservação de embriões de peixes.

Tendo em vista o aperfeiçoamento do processo de reprodução artificial em peixes e a grande importância da biotecnologia de congelação e resfriamento de embriões, este trabalho foi realizado com o objetivo principal prolongar o tempo de estocagem dos embriões pelo resfriamento e desenvolver um protocolo de congelação que permita armazenar embriões de peixes por tempo indeterminado.

### 3. Referência

- AHAMMAD, M.M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B.B. Effect of different concentrations of cryoprotectant and extender on the hatching of Indian major carp embryos (*Labeo rohita*, *Catla catla*, and *Cirrhinus mrigala*) stored at low temperature. **Cryobiology**, San Diego, v.37, n.4, p.318-324, 1998.
- AHAMMAD, M.M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B.B. Hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryo stored at 4 and  $-2^{\circ}\text{C}$  in different concentration of methanol and sucrose. **Theriogenology**, Amsterdam, v.60, n.8, p.1409-1422, 2003.
- AHAMMAD, M.M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B.B. The hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos in response to exposure to different concentrations of cryoprotectant at low temperatures. **Cryobiology**, San Diego, v.44, n.2, p.114-121, 2002.
- ARNOLD, K.; PRATSCH, L.; GAWRISCH, K. Effect of poly (ethylene glycol) in phospholipid hydration and polarity of the external phase. **Biochemic Biophys Acta**, London, v.782, n.2, p.121-128, 1983.
- BART, A. New approaches in cryopreservation of fish embryos. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000. p.179-187.
- BOCK, C. L.; PADOVANI, C. R. Considerações sobre a reprodução artificial e alevinagem de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg,1887) em viveiros. **Acta scientiarum**, Maringa-EDUEM. ed. 22, vol. 2, p.495-501, 2000.
- BRITSKI, H.A. **Peixes do Pantanal. Manual de identificação**. Brasília: Embrapa-SPI. 1999, 184p.

BROOKS, S.; TYLER, C.R.; SUMPTER, J.P. Egg quality in fish: what makes a good egg? **Reviews in fish biology and fisheries**, v.7, p 387-416. 1997.

CABRITA, E. et al. Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). **Cryobiology**, San Diego, v.47, p.204-213, 2003.

CALVI, S.L.; MAISSE, G. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blastomeres: influence of embryo stage on postthaw survival rate. **Cryobiology**, San Diego, v.36, n.4, p.255-262, 1998.

CASTANHOLLI, N.; ZUIM, S.M.F. Consolidação do conhecimento adquirido sobre o pacu, *Colossoma mitrei* – Berg, 1895. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v.5, p.1-2, 1985.

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

DENNISTON, R.; MICHELET, S.; GODKE, R.A. Principles of cryopreservation. In: TIERSCH, T.R. e MAZIK, P.M. Cryopreservation in aquatic species. **World Aquaculture Society**: Baton Rouge. 2000, cap.2, p.59-74.

DINNYÉS, A. B.; URBÁNYI, B.; BARANYAI, I. Magyary Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants: work in progress. **Theriogenology**, Amsterdan, v.50, n.1, p.1-13, 1998.

FAHY, G.M. Cryoprotectant toxicity neutralizers reduce freezing damage. **Cryo-Letter**, Londres, v.4, n.3, p.309-314, 1983.

FINK, A.L. Effects of cryoprotectants on enzyme structures. **Cryobiology**, San Diego, v.23, n.1, p.28-37, 1986.

FORNARI, D. C.; RIBEIRO, R. P.; STREIT JR, D. P.; SIROL, R.N.; POVH, J.A.; CARVALHO, S.; OLIVEIRA, D. Resfriamento de embriões de cascudo preto (*Rhinelepis aspera*) submetidos a diferentes crioprotetores In: 45º CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA., 2008, Lavras. **Anais**. Lavras: UFLA, CD-rum.

GORMAN, O.T. Ecological and genetic considerations for collection of gametes from wild fishes. In: TIERSCH, T.R; MAZIK, P.M. **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society. 2000, cap.8, p.319-322.

GRAÇA, W.J.; PAVANELLI, C. S. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes**. Ed. EDUEM. Maringá. 2007. p.139.

GWO, J.C. Cryopreservation of sperm of some marine fishes. In. TIERSCH, T.R. e MAZIK, P.M. (Eds.). **World Aquaculture Society**: Baton Rouge. p.138-160, 2000.

HAGEDORN, M.; HSU, E.; KLEINHANS, F. W.; WILDT, D. E. New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation. **Cryobiology**, San Diego, v.34, n.4, p.335-347, 1997a.

HAGEDORN, M.; KLEINHANS, F.W.; WILDT, D.E.; RALL, W.F. Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. **Cryobiology**, San Diego, v.34, n.3, p.251-263, 1997b.

- HAGEDORN, M.; PETERSON, A.; MAZUR, P.; KLEINHANS, F.W. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option. **Cryobiology**, San Diego, v.49, n.2, p.181-189, 2004.
- HARVEY, B. Cooling of embryonic cells, isolated blastoderms, and intact embryos of the zebra fish *Brachydanio rerio* to minus -196 Celsius. **Cryobiology**, San Diego, v.20, n.5, p.440-447, 1983.
- HARVEY, B. The application of cryopreservation in fish genetic conservation in North and South America. In: TIERSCH, T.R; MAZIK, P.M. **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society. 2000, cap.8, p.332-337.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal reproduction Science**, v. 62, p.3-22. 2000.
- ISAYEVA, A.; ZHANG, T.; RAWSON, D.M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. **Cryobiology**, San Diego, v.49, n.3, p.114-122. 2004.
- LEIBO, S.P. Sources of variation in cryopreservation. In: TIERSCH, T.R; MAZIK, P.M. **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society. 2000, cap.2, p.75-83.
- LIMA, R.V.A.; BERNARDINO, G.; VAL-SELLA, M.V.; FAVA-DE- MORAES, F.; SCHEMY, R. A.; BORELLA, M. I. Tecido germinativo ovariano e ciclo reprodutivo de pacus (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) mantidos em cativeiro. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v.4, p.1-46, 1991
- LIU, X.H.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Effects of cooling and partial removal of yolk a the chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, Amsterdam, v.55, n.8, p.1719-1731, 2001.
- MAZUR, P. The role intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology**, San Dieg, v. 14, p. 251-272, 1977.
- MORRIS, G.J.; WATSON, P.F. Cold shock injury-a comprehensive bibliography. **Cryo-Letters**, London, v.5, n.4, p.352-372, 1984.
- NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A.A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P.V.; MAKRAKIS, M.C.; PAVANILLI, C.S. **Ovos e larvas de peixes de água doce**. Maringá: EDUEM, Universidade Estadual de Maringá. 2001. p.130-134.
- NEVES, P. R. **Utilização de crioprotetores intra e extracelulares em embriões de pacu (*P. mesopotamicus*)**. 2008, 71p. Tese (Doutorado)-Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, Amsterdam, v.35, n.1, p.109-124, 1991.
- NINHAUS-SILVEIRA, A. **Desenvolvimento Embrionário e Preservação Criogênica de embriões do curimatá, *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (Teleostei, Prochilodontidae)**, 2004. 123p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- NINHAUS-SILVEIRA, A; FORESTI, F.; AZEVEDO, A.; AGOSTINHO, C.A. Structural and ultrastructural characteristics of the yolk syncytial layer in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Teleostei; Prochilodontidae). **Journal Cambridge University Press**. V 15, p.267–271, 2007.

- NINHAUS-SILVEIRA, A. Cryogenic preservation of embryos of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae) **Zygote** Cambridge University. p.1-11. 2008.
- POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. **Nature**, London, v.164, n.5, p.666. 1949.
- REICHENBACH, H. D.; OLIVEIRA, L.; LIMA, P. F.; SANTOS-FILHO, A.S.; ANDRADE, J.C.O. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: GONSALVES P. B.; FIGUEIREDO J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas: aplicação à reprodução animal**. Ed Varela, São Paulo-SP. Cap. 8, 2001. p.127-178.
- RENARD, P.; COCHARD, J. Effect of various cryoprotectants on Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg, Manila clam *Ruditapes philippinarum* Reeve and King scallop *Pecten maximus* (L) embryos: Influence of the biochemical and osmotic effect. **Cryo-Letters**, London, v.10, n.2, 169-180, 1989.
- RIBEIRO, R.P. Espécies Exóticas. In: MOREIRA, L.M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P. **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas, RS: ULBRA, 2001. p. 91-121.
- ROBERTSON, S.M. et al. Toxicity of the cryoprotectants glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol, sucrose, and sea salt solutions to the embryos of red drum. **The Progressive Fish-Culturist**, Bethesda, v.50, n.3, p.148-154, 1988.
- ROMAGOSA, E.; PAIVA, P.; GODINHO, H.M; STORFER, E.B. Desenvolvimento dos ovócitos de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (= *Colossoma mitrei* Berg, 1895) em condições de cultivo intensivo. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.40, p.60-64, 1988.
- SILVA, J.A.; BARROSO, R.M.; BENEVIDES, F.I.M. Utilização de extrato cru de hipófise de frangos (*Gallus domesticus*) como indutor de desova em Curimatá (*Prochilodus scrofa*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Brasília, v.21, p.30-32, 1997.
- SILVA, J.M.A. Toxicidade de soluções crioprotetoras antes do congelamento de embriões de piracanjuba (*Brycon orbygnianus*). In: Aquacultura 2006. **Anais**. Bento Gonçalves, 2006. FURG. CD-rum.
- STONECYPHER Jr.R.W.; HUBERT, W.A.; GERN, W.A. Effect of reduced incubation temperatures on survival of trout embryos. **The Progressive Fish-Culturist**, Bethesda, v.56, n.3, p.180-184, 1994.
- STOSS, J. Fish gamete preservation and spermatozoa physiology. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J.; DONALDSON, E.M. **Fish Physiology**. Orlando: Academic Press, cap.6, 1983. p.305-350.
- STREIT Jr., D.P. **Crioprotetores e resfriamento de embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2005. 73f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- STREIT Jr., D.P.; RIBEIRO, R.P.; MORAES, G.V.; MENDEZ, L.V.; GALO, J.M.; DIGMAYER, M.; POVH, J. A. Características qualitativas do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após indução hormonal. **Bioscience J**. Uberlândia, v. 22. p.119-125. 2006.
- STREIT Jr., D.P.; DIGMAYER, M.; RIBEIRO, R.P.; SIROL, R.N.; MORAES, G.V.; GALO, J.M. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p.1199-1202. 2007.
- STRÜSSMANN, C.A.; NAKATSUGAWA, H.; TAKASHIMA, F.; HASOBE, M.; SUZUKI, T.; TAKAI, R. Cryopreservation of isolated fish blastomeres: effects of cell stage,

cryoprotectant concentration, and cooling rate on postthawing survival. **Cryobiology**, San Diego, v.39, n.3, p.252-261, 1999.

URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM. 2005.p 225-246.

VAZZOLLER, A.E.A de M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos. Teoria e prática**. Maringá: Ed. Universidade Estadual de Maringá, 1996. p.123.

WHITTINGHAM, D. G.; LEIBO, S.P.; MAZUR, P. Some factors affecting embryo storage in laboratory animals. In: Simposium on the freending of mammalian embryos, 1977. Amsterdam . **Anais**. Amsterdam: Ciba Foundation. p.97-127.

WHITTINGHAM, D. G.; LEIBO, S.P.; MAZUR, P. Survival of mouse embryos by frozen to 196°C and -296°C. **Science**, Washington, v.178, p.411-414, 1972.

WILLADSEN S.M.; POLGE, C.; ROWSON, L. E.A. Deep-Freezing of sheep embryos. **Journal of Reproduction and fertility**, Cambridge, v.46, p.151-154, 1976.

WILLADSEN S.M.; POLGE, C.; ROWSON, L. E.A. The viability of deep fronz cow embryos. **Journal of Reproduction and fertility**, Cambridge, v.46, p.391-393, 1978.

WILMUT, I. The effect of cooling rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. **Life Science**, Elmsford, v. 1, p.71-1079, 1972.

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

ZHANG, T.; RAWSON, D.M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology**, San Diego, v.32, n.3, p.239-246, 1995.

ZHANG, Y.Z. ZHANG S.C., LIU X.Z.; XU Y.J.; HU, J.H.; XU, Y.Y.; LI, J.; CHEN, S.L. Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. **Theriogenology**, Amsterdam, v.63, n.3, p.763-773, 2005.

## II. OBJETIVOS GERAIS

a) Avaliar a sensibilidade de embriões de *P. mesopotamicus* estocados a baixa temperatura em diferentes períodos, com solução contendo crioprotetor intracelular (metanol) associado a diferentes concentrações de crioprotetor extracelular (sacarose). b) Testar a criopreservação de embriões de *P. mesopotamicus* pelo método de congelação lenta, submetidos a diferentes concentrações de sacarose associado ao metanol, a fim de se estabelecer um protocolo de congelação e avaliar efeitos sobre os embriões.

## **Embriões de pacu resfriados com sacarose associada ao metanol em diferentes tempos de estocagem**

**Resumo** - O trabalho foi realizado com objetivo de avaliar a viabilidade dos embriões de *P. mesopotamicus* submetidos a diferentes tempos de estocagem a  $-8^{\circ}\text{C}$ , testando soluções crioprotetoras com diferentes concentrações de sacarose associadas a metanol. Os tratamentos consistiram de 8,5%, 17,0%, 25,5% e 34,0% de sacarose associadas a 9% de metanol, mais um controle. Em cada concentração os embriões foram avaliados 6h, 12h, 24h e 48 horas de resfriamento, totalizando 20 tratamentos. No período de seis horas de resfriamento não ocorreu diferença significativa entre as concentrações de 17, 25,5 e 34 % de sacarose. No tempo de estocagem de 12 horas, verificou-se menor percentagem de eclosão em todos os tratamentos, quando comparado ao período de seis horas. O tempo de 24 horas de estocagem a  $-8^{\circ}\text{C}$  possibilitou a sobrevivência de embriões apenas no tratamento com 8,5% de sacarose associada com 9% de metanol. Em 48 horas de estocagem não se observou eclosão. Os resultados do presente estudo sugerem a utilização de 17%, 25,5% ou 34% de sacarose em solução crioprotetora associados a 9% de metanol para armazenamento de embriões de *P. mesopotamicus* por 6 horas a  $-8^{\circ}\text{C}$ . Para 12 horas sugere-se 8,5%, 17% ou 25,5% de sacarose na solução crioprotetora associados a 9% de metanol. Quando o tempo de estocagem se prolonga para 24 horas, a viabilidade dos embriões só é permitida com a utilização de 8,5% de sacarose associada a 9% de metanol.

Termos para indexação: incubação, preservação, *P. mesopotamicus*, peixes neotropicais, reprodução.

## **Pacu embryos freezing with sucrose associated with methanol in different storage times**

**Abstract** - The work was carried out with objective of evaluating the viability of *P. mesopotamicus* embryos submitted at different storage times at  $-8^{\circ}\text{C}$ , testing cryoprotectants solutions with different sucrose concentrations associated to methanol. The treatments consisted of 8.5%, 17.0%, 25.5% and 34.0% of sucrose associated to 9% of methanol, one more control. In each concentration the embryos were evaluated at 6, 12, 24 and 48 hours of cooling, totaling 20 treatments. In the period of six hours of cooling it was not observed significant difference among the concentrations of 17.0%, 25.5% and 34% of sucrose. For the storage time of 12 hours, it was observed a lower hatching percentage in all treatments, when compared to the period of six hours. The storage time of 24 hours at  $-8^{\circ}\text{C}$  made possible the survival of embryos just for treatment with 8.5% of sucrose associated with 9% of methanol. In 48 hours of storage it was not observed embryos hatching. The results of the present study suggest the use of 17%, 25.5% or 34% of sucrose in cryoprotectant solution associated to 9% of methanol embryos storage of *P. mesopotamicus* for 6 hours at  $-8^{\circ}\text{C}$ . For 12 hours it is suggested 8.5%, 17.0% or 25.5% of sucrose in the cryoprotectant solution associated to 9% of methanol. When the storage is prolonged for 24 hours, the viability of the embryos is only allowed with the use of 8.5% of sucrose associated to 9% of methanol.

Index terms: incubation, fish, preservation, *P. mesopotamicus*, reproduction.

## **Introdução**

A criopreservação de embrião com eficiência ainda não é possível de ser realizada em peixes. No entanto, a técnica de resfriamento já é uma realidade. Estudos conduzidos por Streit Jr. et al. (2007) mostraram ser possível armazenar embriões de *P. mesopotamicus* a baixas temperaturas, sem perdas significativas na taxa de eclosão.

Essa biotecnologia permite inúmeras aplicações práticas, tais como: transporte de embriões obtidos em locais remotos (Ahammad et al., 2003); otimização de incubadoras em laboratórios de reprodução (Streit Jr. et al., 2007); preservação de espécies ameaçadas de extinção; transporte a longa distância (evitando grandes volumes de água e cilindro de oxigênio); prevenção na transmissão de patógenos ou ainda como ferramenta em programas de melhoramento genético.

No Brasil, o desenvolvimento da piscicultura e preocupações ambientais são temas recorrentes. Em função de construções de barragens para geração de energia por meio de hidroelétricas, das poluições urbanas e agrícolas, além da pesca predatória, algumas espécies de peixes têm sofrido drástica redução dos estoques naturais (Agostinho et al., 2005). Dentre as principais espécies sul-americanas o pacu (*P. mesopotamicus*), peixe apreciado no interior do Brasil, principalmente, pelo seu valor organoléptico, vêm se destacando na piscicultura brasileira (Urbinati & Gonçalves, 2005). Soma-se a estas qualidades a sua procura para a pesca esportiva e extrativa (Lima et al., 1991). No entanto, sua captura em alguns rios Brasileiros como Paranapanema já passou a ser incomum (Britto et al., 2003)

A técnica de resfriamento consiste em submeter o embrião a uma solução crioprotetora e mantê-los estocados por um determinado período de tempo em baixas temperaturas. Para submeter o embrião a temperatura negativa é necessária a utilização de crioprotetores (Harvey, 1983), com o objetivo de evitar a formação de cristais de gelo intracelulares (Leibo, 2000). Esta solução pode ser composta pela associação de um crioprotetor de ação intracelular com outro extracelular (Holt, 2000). Entre os crioprotetores intracelulares, o metanol vem

apresentando bons resultados para espécies neotropicais, principalmente, pela sua grande eficiência na desidratação, evitando injúrias durante os processos de resfriamento (Streit Jr. et al., 2007). Contudo seu efeito pode ser otimizado quando associado a um crioprotetor de ação extracelular como a sacarose. Para Denniston et al. (2000), esse açúcar provoca aumento da concentração extracelular do soluto, provocando o fechamento das células embrionárias para água extracelular.

Alguns trabalhos destacam o uso da sacarose associada ao metanol para submeter embriões de peixes a baixas temperaturas. De acordo com Streit Jr. et al. (2007) o tempo de estocagem foi de seis horas a temperatura de  $-8^{\circ}\text{C}$ , utilizando sacarose e metanol, obtendo alta taxa de eclosão. Outro trabalho com resfriamento foi realizado por Ahammad et al. (1998) com três espécies de carpa (*Labeo rohita*, *Catla catla* e *Cirrhinus mrigala*), que constataram alta taxa de sobrevivência de embriões quando estocados a  $-4^{\circ}\text{C}$  utilizando metanol e sacarose

Deste modo, o trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a viabilidade dos embriões de *P. mesopotamicus* submetidos a diferentes períodos de estocagem a  $-8^{\circ}\text{C}$ , testando soluções crioprotetoras com diferentes concentrações de sacarose associadas ao metanol, a fim de determinar a melhor concentração do crioprotetor extracelular.

## **Material e métodos**

### *Local*

O experimento foi conduzido na estação de aquicultura da “Duke Energy” Brasil, Salto Grande, SP, no período reprodutivo de 2007/2008, pelos grupos de pesquisa PeixeGen/UEM e Aquam/UFRGS.

### *Reprodução dos animais e obtenção dos embriões*

Os animais para os animais fornecedores dos embriões foram selecionados dentre um lote de 400 reprodutores. Para a escolha, as seguintes características externas foram avaliadas, de acordo com Woynarovich & Horváth (1983) para peixes neotropicais: abdome abaulado,

macio e papila urogenital saliente e avermelhada nas fêmeas; e nos machos, pela fluidez do sêmen obtido por massagem abdominal suave.

Para obtenção dos gametas, os reprodutores foram induzidos com extrato de hipófise de carpa, que nas fêmeas foi aplicado uma dosagem de 5,5 mg/Kg, em duas vezes (10% na primeira aplicação e o restante na segunda), com intervalo de 12 horas entre as injeções, e nos machos 2,5 mg/Kg em dose única, coincidindo com a segunda dose das fêmeas. A temperatura foi aferida a cada hora após a última injeção para determinação da hora-grau. Para esta região em pacu, está em torno de 240 horas-grau.

Após a obtenção dos gametas promoveu-se a fertilização e os ovos foram colocados em incubadoras de sete litros, permanecendo até a seleção dos embriões. Para a seleção dos embriões verificou-se o fechamento do blastóporo, que ocorreu com oito horas após a fecundação, em temperatura com média de  $27,4 \pm 0,8^\circ\text{C}$ . Para tanto selecionou-se os embriões viáveis em estágio de epibolia (fechamento do blastóporo) (Figura 1-A), excluindo ovos gordos (Figura 1-B). A seleção foi feita com auxílio de pipeta de transferência (pasteur). Feita a seleção, os embriões foram separados em alíquotas com 100, para serem submetidos aos tratamentos de resfriamento. Ao término do experimento avalio-se a viabilidade das larvas “taxa de eclosão” (Figura 1-C).



Figura 1: A- Estádio 75% de epibolia (fechamento do blastóporo); B- Ovo gordo; C- Larva viva. Imagens obtidas através de um esteriomicroscópio (40X) com auxílio de uma câmera digital 7,2 mega pixels.

#### *Experimento de resfriamento*

Os tratamentos consistiram de quatro diferentes níveis de inclusão de sacarose em soluções contendo 9% de metanol e mais um controle, tendo como base o protocolo de resfriamento sugerido por Streit Jr. (2007). No tratamento cinco, foi utilizado apenas água (Tabela 1). Todas as soluções e mais o tratamento sem crioprotetor foram submetidos a estocagem de 6h, 12h, 24h e 48 horas, em ambiente com temperatura controlada de -8°C, utilizando para isso um refrigerador vertical. Foram realizadas repetições durante quatro semanas. Os tratamentos foram refeitos em tréplica, a não ser na primeira semana que foi em duplicata, totalizando 11 observações. Cada observação (repetição) consistiu de um tudo de vidro com 6 mL de solução contendo 100 embriões, este foi considerado a unidade experimental. Ao final do experimento, 22.000 embriões foram submetidos ao resfriamento, divididos em seus respectivos tratamentos.

**Tabela 1.** Composição das soluções crioprotetoras usadas no resfriamento de embriões de pacu (*P. mesopotamicus*) a -8°C em quatro tempos de estocagem.

Tratamento	SAC M <sup>(1)</sup>	CRIOPROTETORES (%)		Água (mL)
		SAC (g) <sup>(2)</sup>	MET (mL) <sup>(3)</sup>	
1	0,25	8,50	9,00	82,50
2*	0,50	17,00	9,00	73,90
3	0,75	25,50	9,00	65,35
4	1,00	34,00	9,00	56,80
5	0,00	0,00	0,00	100,00

<sup>1</sup>Sacarose em molaridade, <sup>2</sup>sacarose em porcentagem, <sup>3</sup>metanol em porcentagem. \* Protocolo de resfriamento sugerido por Streit Jr. et al. (2007).

A cada seleção de embriões viáveis uma alíquota da mesma quantia que foi utilizada nos tratamentos (100 embriões) foi alocada diretamente para as incubadoras sem sofrer resfriamento ou ação de crioprotetores, para observação de taxa de eclosão e verificar a viabilidade dos embriões selecionados, sem ação dos tratamentos.

As diferentes concentrações de sacarose no presente experimento são representadas na forma de porcentagem e molaridade, para efeito comparativo com outros trabalhos e apresentação em gráficos e tabelas no decorrer da discussão. As conversões das unidades de

porcentagem em molaridade seguiram-se segundo os valores determinados nas especificações do fabricante no rótulo do frasco (sacarose, marca registrada: Nuclear).

Adotou-se o método de resfriamento lento dos embriões, sugerido por Ahammad et al. (2003) para embriões de *Cyprinus carpio*. Os embriões em seus respectivos tratamentos já nos tubos de vidro “vacutainer” vedados, foram colocados em água previamente resfriada a temperatura de 15°C durante 10 min. Em seguida, estes foram transferidos para outro recipiente a 5°C durante 10 minutos e posteriormente colocados no refrigerador a -8°C e mantidos nos respectivos tratamentos, durante os tempos de 6h, 12h, 24h e 48 horas. Após o período de estocagem proposto os embriões foram retirados do refrigerador e transferidos para incubadoras de três litros.

Nas respectivas incubadoras os embriões foram mantidos dentro dos tubos de vidro sem abrir, durante dois minutos, para aí sim foram liberados nas incubadoras, até a eclosão das larvas. Quando verificou-se a eclosão das larvas retirou-se e foram contados junto com ovos gorados para determinar a exata taxa de eclosão.

#### *Taxa de fertilização e taxa de eclosão:*

A maneira de calcular as taxas de fertilização e de eclosão está descritas a seguir:

*Taxa de fertilização:* após o fechamento do blastóporo (6 horas após a fecundação), contaram-se as três amostras de cada incubadora para obtenção de uma média dos embriões viáveis e dos ovos gorados.

*Taxa de eclosão:* quando verificou-se a eclosão das larvas, estas foram retiradas da incubadora e transferidas para placas de petri e, com auxílio de um estereomicroscópio essas foram contadas e determinou-se a taxa de eclosão.

#### *Análise estatística*

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial de 5 x 4 x 11, sendo cinco soluções crioprotetoras submetidas a quatro diferentes

tempos de estocagem com 11 repetições. Cada unidade experimental foi formada de 100 embriões.

Os dados foram submetidos a análise de variância e regressão pelo “PROC GLM”, ambos do pacote estatístico SAS (SAS Institute, Cary, USA).

### **Resultados e Discussão**

A média da taxa de fecundação dos embriões de reprodutores *P. mesopotamicus* do presente estudo foi de  $88,60 \pm 8,2$ , conferindo uma elevada taxa de fecundação que de acordo com afirmação de Lahnsteiner (2008) esse parâmetro reflete na resistência a baixas temperaturas. Para os embriões selecionados viáveis sem resfriamento a taxa de eclosão foi de  $93,40 \pm 2,14\%$  esse resultado podendo servir como comparativo na avaliação da eficiência do crioprotetor.

Não houve diferença estatística ( $p < 0,0001$ ) quando avaliou-se a taxa de eclosão entre os tratamentos com 17,0, 25,5, e 34% de sacarose. Porém, o tratamento com 8,5% de sacarose não apresentou a mesma eficiência, com taxa de eclosão inferior aos demais tratamentos ( $P < 0,0001$ ). No entanto, quando se compara ao tratamento sem crioprotetor todos se apresentaram com melhor índice (Tabela 2).

A eficiência em manter vivos os embriões de *P. mesopotamicus* submetidos ao resfriamento, quando da utilização do metanol associado a sacarose, foi evidente no presente estudo. Confirma-se pelo fato de, não ocorrer desenvolvimento embrionário quando não foi utilizado crioprotetor em que 100% dos embriões não eclodiram ao serem submetidos ao resfriamento por seis horas de estocagem (Tabela 2). Outro fato que torna evidente o efeito benéfico do crioprotetor é a taxa de eclosão dos embriões selecionados viáveis (sem resfriamento) que foi de  $93,40 \pm 2,14\%$ , nota-se pequena diferença em comparação aos resultados dos tratamentos que se utilizou solução crioprotetora e sofreram resfriamento.

O resultado da viabilidade dos embriões a baixas temperaturas no presente estudo é atribuído a utilização das soluções crioprotetoras. As características do metanol, que apresenta eficiência na desidratação das células vêm sendo testadas em muitos trabalhos, demonstrando ser um eficiente crioprotetor com ação intracelular para criopreservação de embriões de peixes (Hagedorn et al., 1997; Dinnyés et al., 1998; Ahammad et al., 1998; Streit Jr. et al. 2007). Zhang & Rawson (1995) utilizaram metanol, DMSO, propano-1,2 diol no resfriamento de embriões de *Brachydanio rerio* e mostraram que o metanol foi o de melhor eficiência em todas as temperaturas testadas (0, -5°, -10° e -15°C), fato explicado pela sua baixa toxicidade e boa permeabilidade de membrana (Cabrita et al., 2006).

A eficiência do metanol é ainda potencializada quando associado a um crioprotetor extracelular (Denniston et al., 2000), que no presente estudo foi a sacarose. Essa eficácia é explicada, em função de suas propriedades estruturais. De acordo com Woelders (1997), essa afirmativa está relacionada à contribuição desse açúcar na estabilidade da membrana celular, principalmente quando se refere à deformação mecânica provocada por efluxo de água e o influxo de crioprotetor intracelular. Além disso, Holt (2000) relatou que açúcares apresentam forte influência na manutenção da pressão osmótica, o que também foi verificado por Lehnsteiner (2008) que ao associar 40% de sacarose a uma solução com 40% de crioprotetor intracelular promoveu inicialmente uma forte desidratação no embrião, porém, após um prolongado tempo de incubação ocorreram alterações no embrião, destacando o uso de sacarose na auto-regulação da osmolaridade.

A ação benéfica da associação do metanol à sacarose no resfriamento de embriões de peixes também foi verificado em estudos realizado por outros autores. Com embriões de *P. mesopotamicus* Streit Jr. et al. (2007) verificaram taxa de eclosão de 69,2, quando os embriões foram resfriados a -8°C em solução crioprotetora contendo 17% de sacarose associado a 9% de metanol durante seis horas. Com outras espécies, o metanol associado com

sacarose 0,1M mostrou ser a melhor solução para crioproteção de embriões de zebrafish (*Brachidanio rerio*), quando expostos as baixas temperaturas (Zhang & Rawson, 1995). Ahammad et al. (1998) encontraram alta taxa de sobrevivência de embriões de três espécies de carpa (*Labeo rohita*, *Catla catla* e *Cirrhinus mrigala*) quando estocados em temperaturas de 4 ° C, após serem submetidos a solução crioprotetora com metanol (1, 2 e 3M), associados a sacarose (0,5M). Esses autores concluíram que a adição de sacarose no metanol (1 e 2M) foi essencial para a sobrevivência dos embriões de *Cirrhinus mrigala* e atribuíram efeitos genéticos aos resultados do experimento.

No entanto, quando o tempo de estocagem foi elevado para 12 horas os tratamentos não responderam com a mesma eficiência. Contudo as taxas de eclosão das larvas podem ser consideráveis (Tabela 3). O que confere o efeito benéfico dos crioprotetores a sobrevivência dos embriões estocados também por 12 horas, essa fato é confirmado por não ocorrer eclosão na solução sem crioprotetor resfriado durante o mesmo período, 100% dos ovos goraram.

Observou-se maior percentagem de ovos gorados em todas as soluções testadas na estocagem de 12 horas quando comparado pelo tempo de estocagem de seis horas. A solução com 34% de sacarose na estocagem de 12 horas, onde havia maior concentração de sacarose resultou o pior índice da taxa de eclosão, diferindo significativamente quando comparado as demais soluções testadas ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 3).

Os embriões permaneceram imersos nas soluções crioprotetoras durante o tempo de estocagem e, provavelmente, tenha ocorrido o efeito contínuo da ação dos crioprotetores, em função do evento osmótico relacionado ao tempo de estocagem. Isso pode ter influenciado nos resultados. O efeito osmótico significativo exercido pela sacarose provoca uma proteção à desidratação demasiada na pré-congelação (Zhang & Rawson 1995), reduzindo a toxidez dos crioprotetores intracelulares (Ahammad et al., 2003). Porém, os mesmos autores relataram que altas concentrações de sacarose podem promover alterações estruturais nos embriões.

Portanto, as maiores concentrações utilizadas, principalmente, quando se utilizou 34% de sacarose e verificou-se 69,26% dos ovos inviáveis, confirmam essa hipótese (Tabela 3).

O tempo de estocagem de 24 horas permitiu a sobrevivência de larvas apenas no tratamento com menor concentração de sacarose (8,5%) com taxa de eclosão de 26,04%, nos demais tratamentos (17,0, 25,5 e 34% de sacarose) não foi observado eclosão, nem mesmo desenvolvimento embrionário (Tabela 4). Por outro lado quando o período de estocagem se prolongou para 48 horas não foi observada nenhuma eclosão em nenhum tratamento, resultando em 100% dos ovos gorados.

Muito embora os resultados do tratamento com 8,5% de sacarose tenham possibilitado a eclosão de apenas 26,4% de larvas, quando os embriões foram estocados por 24 horas (Tabela. 4), este protocolo possibilita a sua utilização no salvamento de espécies quando ameaçadas por desastre ecológico como o vazamento de algum agente tóxico nos rios ou mares, como derramamento de petróleo. Neste enfoque, a aplicação da técnica pode ser vantajosa mesmo que apresenta baixa viabilidade, considerando que milhões ou bilhões de embriões estariam correndo risco de sofrer a catástrofe. Como o simples protocolo de resfriamento poderiam ser capturados de locais remotos e transportados de uma distância que perdure até 24 horas até laboratório equipado, garantindo assim a sobrevivência da espécie e manutenção de seus gens.

O fato dos embriões terem apresentado menor resistência quando expostos a períodos mais prolongados, pode estar relacionado a exposição a baixa temperatura, o que evidencia a sensibilidade do embrião de *P. mesopotamicus* quando estocados por longo período. Outro fator que pode estar relacionado são as concentrações de sacarose nas soluções, que provavelmente estaria diminuindo a disponibilidade de oxigênio para metabolismo do embrião em função do aumento da quantidade do soluto nas diferentes soluções crioprotetoras. Segundo Zhang et al. (2003), o efeito da falta de oxigênio pode levar a

diminuição da fosforilação oxidativa nos embriões, sendo essa reação bioquímica fundamental para sua sobrevivência. O fato da menor concentração de sacarose ter possibilitado eclosão das larvas mesmo quando os embriões foram estocados durante 24 horas (Tabela 4), reforça essa hipótese. Segundo Guan et al. (2008), a atividade mitocondrial nos ovos de peixes decresceram 42,6% e 98,3% em produção de ATP, quando estocados a baixas temperatura durante 30 minutos e duas horas respectivamente. Verificaram ainda que essa redução de ATP provocou a ruptura de microfilamentos, sendo estruturas vitais para a sobrevivência do embrião. De acordo com Ahammad et al. (2003), altas concentrações de sacarose, quando associadas ao metanol, podem provocar ruptura do vitelo resultando em mortalidade. Podendo ser esta uma das explicações para o fraco desempenho, quando se utilizou concentrações maiores que 0,5M (17%) de sacarose em todos os tempos de estocagem quando comparado ao melhor tratamento (Figura 2).

### **Conclusão**

Embriões de *P. mesopotamicus* podem ser preservados até 24 horas com taxa de eclosão de 26,04%, utilizando um protocolo de resfriamento contendo 8,5% de sacarose e 9% de metanol.

O uso de crioprotetores é fundamental para sobrevivência de embriões de *P. mesopotamicus*, quando armazenados a -8°C.

Quando o tempo de estocagem for de seis horas sugere-se utilizar 17,0%, 25,5% ou 34% de sacarose associado a 9% de metanol, porém, se o tempo requerido for de 12 horas sugere-se utilizar 8,5%, 17,0% ou 25,5% de sacarose associado a 9% de metanol em soluções crioprotetoras.

## Referências

- AGOSTINHO, A. A.; GOMES L. C.; SUZUKI H. I.; JÚLIO Jr. H. F. Migratory fishes of the Upper Paraná River Basin, Brasil. In: CAROLSFELD D. (Ed). **Migratory fishes of south América: biology, fisheries and conservation status**. V: IDRC-World Bank –World fisheries Trust, 2003. p. 19-98.
- AHAMMAD, M.M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B.B. Effect of different concentrations of cryoprotectant and extender on the hatching of Indian major carp embryos (*Labeo rohita*, *Catla catla*, and *Cirrhinus mrigala*) stored at low temperature. **Cryobiology**, San Diego, v.37, n.4, p.318-324, 1998.
- AHAMMAD, M.M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B.B. Hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryo stored at 4 and  $-2^{\circ}\text{C}$  in different concentration of methanol and sucrose. **Theriogenology**, Stoneham, v.60, n.8, p.1409-1422, 2003.
- BRITTO, S.G.C.; SIROL, R.N.; VIANNA, N.C. Peixes do rio Paranapanema. São Paulo: Duke Energy International Geração Paranapanema. 2003. 112p.
- CABRITA, E.; ROBLES, V.; WALLACE, J.C.; SARASQUETE, M.C.; HERRÁEZ, M.P. Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. **Aquaculture**. v.251, p.245-255, 2006.
- DENNISTON, R.; MICHELET, S.; GODKE, R.A. Principles of cryopreservation. In: TIERSCH, T.R. and MAZIK, P.M. Cryopreservation in aquatic species. **World Aquaculture Society**: Baton Rouge. 2000, cap.2, p.59-74
- DINNYÉS, A. B.; URBÁNYI, B.; BARANYAI, I. Magyary Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants: work in progress. **Theriogenology**, Stoneham, v.50, n.1, p.1-13, 1998.
- GUAN, M.; RAWSON, D.M.; ZHANG, T. cryopreservation of zebrafish (*Dario rerio*) oocytes using improved controlled slow cooling protocols. **Cryobiology**. v. 56. p.204-208. 2008.
- HAGEDORN, M.; HSU, E.; KLEINHANS, F. W.; WILDT, D. E. New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation. **Cryobiology**, San Diego, v.34, n.4, p.335-347, 1997
- HARVEY, B. Cooling of embryonic cells, isolated blastoderms, and intact embryos of the zebra fish *Brachydanio rerio* to minus  $-196$  Celsius. **Cryobiology**, San Diego, v.20, n.5, p.440-447, 1983.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal reproduction Science**, Philadelphia, v. 62, p.3-22, 2000.
- LAHNSTEINER, F. The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Dario rerio*) embryo. **Theriogenology**, Amsterdam, v.69, p.384-396, 2008.
- LEIBO, S.P. Sources of variation in cryopreservation. In: TIERSCH, T.R; MAZIK, P.M. **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society. 2000, cap.2, p.75-83.
- LIMA, R.V.A.; BERNARDINO, G.; VAL-SELLA, M.V.; FAVA-DE-. MORAES, F.; SCHEMY, R. A.; BORELLA, M. I. Tecido germinativo ovariano e ciclo reprodutivo de pacus

(*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) mantidos em cativeiro. **Boletim Técnico do CEPTA**. Pirassununga. v.4, p.1-46, 1991

STREIT Jr., D.P.; DIGMAYER, M.; RIBEIRO, R.P.; SIROL, R.N.; MORAES, G.V.; GALO, J.M. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p.1199-1202. 2007

URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTO, B. GOMES, L.C. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM. 2005. p.225-246.

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

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais**: manual de extensão. Tradução de chama, V.L.M. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq, 1983. p. 225.

ZHANG, T.; RAWSON, D.M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology**, San Diego, v.32, n.3, p.239-246, 1995.

ZHANG, Y.Z.; LIU X.Z.; RAWSON D.M. Effects of methanol and developmental arrest on chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryo. **Theriogenology**, Amsterdam, v.59, p.1545-1556, 2003.

## Tabelas

**Tabela 2.** Viabilidade de larvas de *P. mesopotamicus* (%) após seis horas de resfriamento a -8°C utilizando diferentes crioprotetores.

Concentração de sac* (%)	Ovos gorados	Taxa de eclosão
T1 8,5 (0,25 M)	25,91 <sup>b</sup> ± 2,96	74,08 <sup>b</sup> ± 2,96
T2 17 (0,50 M)	14,99 <sup>a</sup> ± 2,14	85,00 <sup>a</sup> ± 2,14
T3 25,5 (0,75 M)	19,44 <sup>ab</sup> ± 2,14	80,55 <sup>ab</sup> ± 2,14
T4 34 (1,00 M)	19,08 <sup>ab</sup> ± 2,27	80,91 <sup>ab</sup> ± 2,27
T5 100% água	100 <sup>c</sup>	0,00
P	<0,0001	<0,0001
CV %	43,39	8,46

Valores apresentados são médias ± erro padrão. \*sacarose. <sup>abc</sup> Médias sem letras em comum na coluna diferem entre si pelo teste de tukey a 0,05%.

**Tabela 03.** Viabilidade de larvas de *P. mesopotamicus* (%) após 12 horas de resfriamento a -8°C utilizando diferentes crioprotetores.

Concentração de sac* (%)	Gorados	Taxa de eclosão
T1 8,5 (0,25M)	40,65 <sup>a</sup> ± 4,01	59,34 <sup>a</sup> ± 4,01
T2 17 (0,50M)	35,98 <sup>a</sup> ± 3,47	64,01 <sup>a</sup> ± 3,47
T3 25,5 (0,75M)	48,46 <sup>a</sup> ± 3,62	51,53 <sup>a</sup> ± 3,62
T4 34 (1,00M)	69,26 <sup>b</sup> ± 3,47	30,71 <sup>b</sup> ± 3,47
T5 100% água	100 <sup>c</sup>	0
P	<0,0001	<0,0001
CV %	25,83	15,89

\*sacarose. <sup>abc</sup> Médias sem letras em comum na coluna diferem entre si pelo teste de tukey a 0,05%

**Tabela 04.** Viabilidade de larvas de *P. mesopotamicus* (%) após 24 horas de resfriamento utilizando diferentes crioprotetores.

Concentração de sac* (M)	Gorados	Taxa de eclosão
T1 8,5 (0,25M)	73,95 <sup>a</sup> ± 3,48	26,04 <sup>a</sup> ± 3,48
T2 17 (0,50M)	100 <sup>b</sup>	0
T3 25,5 (0,75M)	100 <sup>b</sup>	0
T4 34 (1,00M)	100 <sup>b</sup>	0
T5 100% água	100 <sup>b</sup>	0
P	<0,0001	<0,0001
CV %	27,00	16,46

\*sacarose, \*\*Controle positivo sem observado no momento 0, sem criopreservação.

<sup>abc</sup> Médias sem letras em comum na coluna diferem entre si pelo teste de tukey a 0,05%

<sup>1</sup> dados excluídos da análise estatística

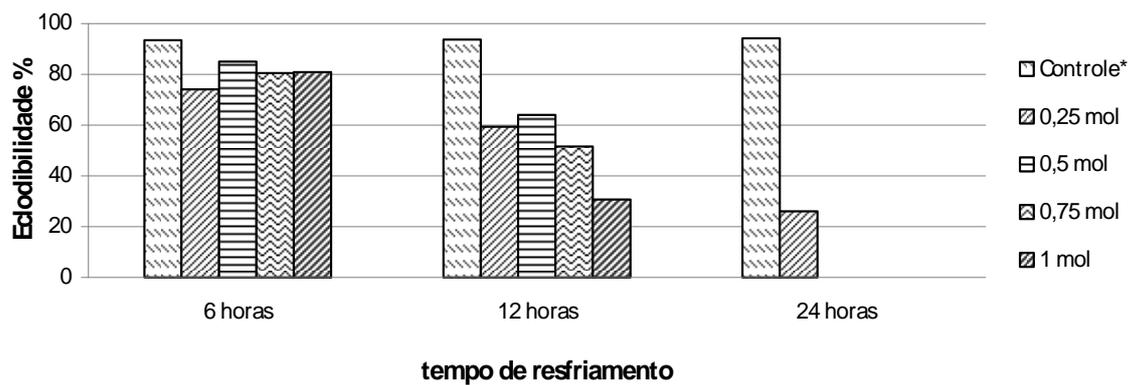


Figura 2. Médias de eclodibilidade de larvas de *P. mesopotamicus* submetidos ao resfriamento a  $-8^{\circ}\text{C}$  em diferentes tempos de estocagem, com solução crioprotetora 9% de metanol associado a diferentes concentrações de sacarose.\* taxa de eclosão controle, sem resfriamento e sem crioprotetor.

### **Criopreservação de embriões de pacu utilizando diferentes concentrações de sacarose**

Resumo- O estudo foi realizado com objetivo de avaliar diferentes concentrações de sacarose associadas ao metanol como soluções crioprotetoras para desenvolver um protocolo de congelação de embriões de *P. mesopotamicus*. Foram utilizados 225 embriões viáveis em estágio de pós-gástrula, divididos em cinco tratamentos e três repetições. Os tratamentos utilizados foram soluções com 0,25%, 0,50%, 0,75% e 1,00 M de sacarose associadas a 9% de metanol e mais um controle (somente água). Para submeter à queda de temperatura gradual utilizou-se um aparelho de resfriamento "BIOCOM" com curva de congelação programável de 0,5°C/min, armazenados em nitrogênio líquido quando a temperatura atingiu -33°C. Os embriões foram descongelados para se avaliar possíveis da taxa de eclosão. Para todos os tratamentos foram coletadas amostras para análise em eletromicrografia de varredura. Através da eletromicrografia de varredura pode se observar algumas alterações morfológicas, principalmente nos tratamentos com maior concentração de sacarose. Os protocolos de congelação testados não evitaram a formação de cristais de gelo, consequentemente às deformações embrionárias, inviabilizando os embriões de *P. mesopotamicus*.

Termos de indexação: crioprotetores, *P. mesopotamicus*, reprodução

### **Cryopreservation of pacu embryos through the conventional freezing technique using different sucrose concentrations**

Abstract – The study was carried out with objective of evaluating different sucrose concentrations associated to the methanol as cryoprotectants solutions to develop a freezing protocol for embryos of *P. mesopotamicus*. A total of 225 viable embryos at post-gastrula stage were used, divided in five treatments and three replications. The used treatments were solutions with 0.25, 0.50, 0.75 and 1.00 M of sucrose associated to 9% of methanol and one more control (only water). To submit to the fall of gradual temperature a cooling equipment named "BIOCOM" was used with curve of programmable freezing of 0.5°C/min, stored in liquid nitrogen when the temperature reached -33°C. The embryos were thawed to evaluate the possible of hatching tax. For all treatments samples were collected for scanning electron microscopy analyzes. Through the scanning electron microscopy analyzes it is possible to observed some morphologic alterations, mainly in the treatments with larger sucrose concentration. The freezing protocols tested didn't avoid the formation of ice crystals, consequently to the embryonic deformations, making unfeasible the *P. mesopotamicus* embryos.

Índex terms: cryoprotector, *P. mesopotamicus*, reproduction

### **Introdução**

Enquanto as técnicas de criopreservação de embriões de mamíferos têm apresentado resultados consistentes, ainda existem muitos problemas técnicos na congelação de embrião de peixes (Ahammad et al., 1998). As grandes barreiras na criopreservação de embriões de peixes podem ser atribuídas a baixa permeabilidade das membranas embrionárias, grande

tamanho total resultando em uma baixa relação superfície/volume; tamanho das células e a sensibilidade dos ovos a baixa temperatura (Hagedorn et al., 1997; Zhang & Rawson, 1998).

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

A biotécnica de congelamento consiste em manter o embrião em estado quiescente, tornando possível a conservação em nitrogênio líquido por tempo indeterminado (Neves, 2008). Vários métodos de congelamento de embriões bovinos se baseiam em uma curva de congelamento padrão desenvolvido por Willadsen et al. (1976, 1978). Esses trabalhos correlacionam a queda de temperatura em função do tempo, obtido com velocidade de, 3°C a 1°C/minuto, e a indução à cristalização da solução crioprotetora “seeding” na temperatura de -7°C com prosseguimento da queda de temperatura até -33°C a -35°C e, em seguida, armazenado em nitrogênio líquido.

Em peixes, alguns experimentos com congelamento foram realizados com o objetivo de avaliar morfológicamente as injúrias causadas na tentativa de se estabelecer um protocolo, mas, não obtiveram viabilidade dos embriões estudados (Ninhaus-Silveira, 2008; Neves, 2008).

Para submeter embriões a baixas temperaturas é indispensável o uso de crioprotetores (Harvey 1983). Os crioprotetores são classificados de acordo com sua ação, sendo os intracelulares: metanol, etilenoglicol e DMSO (Reichenbach et al., 2001). Os crioprotetores extracelulares mais utilizados são: sacarose, glicose e trealose (Niemann, 1991; Denniston et al., 2000). Ao testar várias combinações de crioprotetores Streit Jr. et al. (2007) sugeriram um

protocolo de resfriamento para *P. mesopotamicus*, utilizando 17% sacarose associado a 9% de metanol.

Das espécies sul-americanas cultivadas no Brasil o *P. mesopotamicus* caracteriza-se como uma das principais devido às excelentes características zootécnicas apropriadas para o cultivo, mostrando grande aceitação na piscicultura e mercado consumidor brasileiro. Observando as qualidades do *P. mesopotamicus*, em meados dos anos setenta, pesquisadores começaram a trabalhar com esta espécie a fim de desenvolver um pacote tecnológico para o cultivo deste peixe (Urbinati & Gonçalves, 2005). Desde então, diversos trabalhos foram e vêm sendo desenvolvidos a fim de viabilizar a sua produção em larga escala (Castagnolli & Zuim, 1985; Lima et al., 1991; Silva et al., 1997).

O presente experimento foi realizado com objetivo de testar soluções crioprotetoras com diferentes concentrações de sacarose associada ao metanol a fim de se estabelecer um protocolo de congelação para embriões de *P. mesopotamicus* os efeitos sobre o embrião.

## **Material e métodos**

### *Local*

O experimento foi conduzido na estação de aquicultura da “Duke Energy - geração Paranapanema, Salto Grande, SP, durante o período reprodutivo 2007/2008, juntamente com o grupo de pesquisa PeixeGen/UEM e *Aquam/UFRGS*.

### *Animais*

Os animais para reprodução foram selecionados dentre um lote de 400 reprodutores. Para a escolha dos animais a serem submetidos à desova, os viveiros foram drenados a um nível de 50% do seu volume total e os animais capturados através de rede apropriada. Esses animais foram selecionados ainda na rede para facilitar a classificação.

Para seleção, foi avaliado o grau de maturação das gônadas determinado pelas seguintes características externas, conforme descrito por Woynarovich & Horváth (1983): abdome abaulado e macio, papila urogenital saliente e avermelhada, na fêmea; e fluidez de sêmen obtido por massagem abdominal suave nos machos. Depois de selecionados foram transferidos para o laboratório e mantidos em aquários de 1000 litros com renovação constante de água.

Para desova utilizou-se extrato hipofisário carpa, que nas fêmeas, foi aplicado uma dosagem de 5,5 mg/Kg, em duas vezes, (10% na primeira aplicação e o restante na segunda), com intervalo de 12 horas entre as injeções. Nos machos, foram administrados 2,5 mg/Kg, em dose única, coincidindo com a segunda dose das fêmeas. A temperatura foi aferida a cada hora, após a última injeção, para determinar a hora-grau. Para esta região, em pacu, está em torno de 240 horas-grau.

Uma hora antes do momento previsto para desova as fêmeas foram observadas e quando as mesmas apresentaram-se em movimentos de desova ou liberação de alguns ovócitos, procedeu-se a extrusão.

Os gametas foram obtidos através do método convencional de extrusão e fecundação dos gametas, executados, através de pressão no sentido encéfalo-caudal, em que os óvulos foram expelidos em um recipiente seco. Em seguida, o macho foi capturado e, semelhantemente à fêmea, através de leve pressão no sentido encéfalo-caudal, o sêmen foi lançado diretamente sobre os ovócitos e imediatamente misturados e homogeneizados. Em seguida, ativados com um volume de 15% de água. Posteriormente os ovos foram colocados em incubadoras, tipo Israel de sete litros.

Para seleção dos embriões verificou-se o fechamento do blastóporo, que ocorreu por volta de seis horas após a fecundação, com temperatura média de  $27,4 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ , tendo sido selecionados os embriões viáveis, com estrutura de desenvolvimento sem alterações, com o

córior intacto e sem deformações (Figura 1). A seleção dos embriões foi feita com auxílio de pipeta de transferência (pasteur) e após isso foram separados em alíquotas de 15 para serem submetidos aos tratamentos.

#### *Experimento de congelação*

Depois de selecionados os 225 embriões viáveis, foram submetidos a soluções contendo diferentes concentrações de sacarose associada com metanol (Tabela 1). Para cada tratamento foram utilizados 45 embriões, divididos em três repetições. Portanto, foram alocados 15 embriões em cada palhete de 0,5mL sendo três palhetes para cada tratamento e submetidos à curva de congelação através de um aparelho de congelação. Utilizou-se o aparelho de congelação “Biocom” (Dominium K), com regulagem para queda de temperatura. Para o presente experimento utilizou-se uma queda de 0,5°C/min. No momento em que estabilizou a curva em -7°C efetuou-se o “seeding”; posteriormente a curva continuou diminuindo 0,5°C/min até atingir -33°C, permanecendo por seis minutos em estabilização, ato em que os embriões foram transferidos para botijão com nitrogênio líquido, permanecendo por sete meses.

**Tabela 1.** Composição das soluções crioprotetoras usadas na congelação de embriões de pacu (*P. mesopotamicus*).

Tratamento	SAC M <sup>(1)</sup>	CRIOPROTETORES (%)		Água (ml)
		SAC (g) <sup>(2)</sup>	MET (ml) <sup>(3)</sup>	
1	0,25	8,50	9,00	82,50
2	0,50	17,00	9,00	73,90
3	0,75	25,50	9,00	65,35
4	1,00	34,00	9,00	56,80
5	0,00	00,00	0,00	100,00

<sup>1</sup>Sacarose em molaridade, <sup>2</sup>sacarose em porcentagem, <sup>3</sup>metanol em porcentagem.

Após o período de armazenamento de sete meses os embriões foram retirados do nitrogênio líquido e descongelados. Para o descongelamento utilizou-se o método procedido em sêmen de peixes, permanecendo por 15 segundos em temperatura de 45°C (Streit Jr. et al.,

2006), com adição de 10% de sacarose com intuito de diminuir a pressão osmótica provocada na hidratação.

Após a descongelação foram colocados diretamente em incubadoras de 1,5 L para completar seu desenvolvimento e verificar possíveis eclosões. Amostras de cada repetição dos tratamentos foram coletadas aleatoriamente e fixadas em Glutaraldeído 2% com tampão fosfato 0,2M a fim de avaliar possíveis deformações estruturais e injúrias, com auxílio de microscopia eletrônica de varredura.

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

As amostras fixadas foram lavadas em álcool com intuito de desidratar para serem submetidas ao ponto crítico. Para desidratação, os embriões foram submetidos a uma série crescente de concentração de álcool de 30%, 50% e 70% por 30 minutos para cada concentração e 90% durante 15 min, repetindo por mais uma vez esta última e, por final, mais dois banhos de 15 min. com 100% de álcool (etanol).

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

O material foi examinado e eletromicrografado em microscópio eletrônico de varredura JEOL (JSM-5410) no setor de microscopia da UFRGS, Porto Alegre-RS.

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

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

Taxa de eclosão controle: no momento da seleção dos embriões, três repetições com 100 embriões foram transferidos diretamente para as incubadoras, sem serem submetidas a

crioprotetores e quando verificou-se a eclosão das larvas, estas foram contadas determinando-se a taxa de eclosão controle.

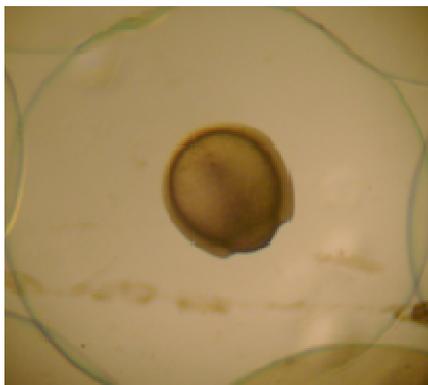


Figura 1. Imagem de embrião de *P. mesopotamicus*, no estágio de pós-gastrulação, 95% de epibolia (fechamento do blastóporo) (esteriomicrocópio, 40X).

### Resultado e discussão

A taxa de fecundação dos ovócitos utilizados no presente experimento se caracterizou como boa fertilização, sendo em média de  $88,60 \pm 8,2\%$ . A qualidade do ovo utilizado na criopreservação é importante, estando relacionado à resistência quando submetidos a baixas temperaturas (Lahnsteiner, 2008). A taxa de eclosão controle (sem criopreservação) no presente experimento foi em média de  $93,40 \pm 2,14$ . Através do resultado da taxa de eclosão controle, pode-se comparar com os tratamentos e atribuir, caso for maior ou menor, o efeito dos mesmos. Após a descongelação dos embriões de *P. mesopotamicus*, embora não tenha ocorrido eclosão, observou-se hidratação e boa conformação em alguns embriões. No entanto, após algumas horas na incubadora verificou-se 100% de ovos gorados.

Foi observado também que no momento da descongelação, ainda dentro dos palhetes, alguns embriões apresentavam coloração esbranquiçada, que segundo Zhang & Rawson (1996), indica a formação de cristais de gelo. Porém, alguns embriões apresentavam-se com coloração translúcida no mesmo momento da descongelação, ainda no palhete e, aparentemente, boa conformação. A formação de cristais de gelo antes mesmo da descongelação, também foi ressaltado por Neves (2008) em embriões de *P. mesopotamicus* e

por Ninhaus-Silveira et al. (2008) em embriões de *P. lineatus*, em que nos dois experimentos havia embriões de coloração esbranquiçada.

Foi observado, nos tratamentos com 8,50%, 17,00% e 25,5% de sacarose, embriões com aspectos morfológicos aparentemente inalterados, no entanto após a hidratação foi observado embriões com presença de córion apenas no tratamento com 17% de sacarose e 9% de metanol.

Para melhor caracterizar prováveis deformações e injúrias nos embriões de *P. mesopotamicus*, causadas pela criopreservação, foram utilizadas imagens feitas através de eletromicrografia de varredura. O uso de estereomicroscópio e microscopia de luz são mais comumente utilizados para caracterização e avaliação embrionária, principalmente, em função do alto custo das análises de eletromicrografia de varredura. Trabalhos como de Galman & Avtalion (1989) e de Shardo (1995) em estudos com *Oreochromis niloticus* e *Alosa sapidissima*, respectivamente, utilizaram como ferramenta com a finalidade de detalhar embriões destas espécies, a eletromicrografia de varredura. Em *P. mesopotamicus*, Neves (2008), destacou as principais injúrias causadas pela congelação com auxílio da eletromicrografia de varredura. Ninhaus-Silveira et al. (2007) verificaram alterações morfológicas em nível estrutural de embriões de *P. lineatus* através da eletromicrografia de varredura e transmissão.

No presente estudo quatro diferentes concentrações de sacarose foram testadas associadas ao metanol, apesar de não ocorrer eclosão, amostras de cada repetição, após a descongelação, foram coletadas, de forma aleatória, para ser observada através de imagens de eletromicrografia de varredura.

Na Figura 2 (A, B e C), verifica-se imagens de embriões de *P. mesopotamicus*, obtidas por eletromicrografia de varredura após a congelação sem crioprotetor, utilizando-se apenas água e descongelação. Nesse tratamento, observaram-se células do blastoderme danificadas

nas três imagens, vitelo totalmente desconfigurado e extravasado, provavelmente, pela ação do resfriamento e formação de cristais de gelo. Nesse tratamento não se observou presença de córion o que também configura provável formação de cristais de gelo que, possivelmente, tenha provocado o rompimento das membranas embrionária e vitelina. Neves (2008) verificou, em eletromicrografia de varredura, embriões de *P. mesopotamicus* totalmente destruídos e sem a presença do córion, justificando a formação de cristais de gelo como o causador das injúrias.

Nos tratamentos que se utilizaram soluções crioprotetoras observou-se injúrias na maioria dos embriões, porém com menor intensidade em alguns dos tratamentos, quando comparado aos embriões sem crioprotetor. Na Figura 3, são imagens de embriões após a congelação e descongelação, utilizando solução crioprotetora com 8,5% de sacarose associado a 9% de metanol. Verificaram-se embriões com injurias em todas as imagens, porém em sua maioria a membrana vitelina não foi destruída. No entanto, a blastoderme não suportou o processo de congelação e o córion apresentou-se com micrósporos totalmente danificados (Figura 2 C), que se trata de uma microestrutura responsável pela proteção e troca de fluidos entre o embrião e o meio externo (Rawson et al., 2000). Essas alterações no córion podem ter sido causadas pelo fluxo/influxo abrupto da água e do crioprotetor. Essa ação mecânica é prevenida utilizando crioprotetores extracelular, em especial a sacarose (Woeldrs, 1997). A fraca proteção pode estar relacionada a baixa concentração de sacarose utilizada (8,5%), não evitando deformação nos micrósporo.

Quando se utilizou 17% de sacarose associado a 9% de metanol a maioria dos embriões apresentaram-se com conformação e boa hidratação. Foi observado também a presença de córion aparentemente não danificado e vitelo sem extravasamento. Entretanto, não se observou eclosão quando descongelados e mantidos em incubadoras. Nas imagens de eletromicrografia de varredura pode-se verificar a blastoderme danificada e a camada sincicial

vitelina com deformação (Figura 4 A, B e C). Em experimento realizado por Ninhaus-Silveira et al. (2007), verificaram, na camada sincicial vitelina de Curimatá (*P. lineatus*), modificações ultraestruturais após a congelação e descongelação dos embriões, quando comparados com embriões não congelados.

O tratamento com 25,6% de sacarose associada a 9% de metanol, após congelação e descongelação, apresentou estruturas embrionárias totalmente danificadas e reduzidas, camada sincicial danificada, córion rompido em todos os embriões e vitelo totalmente desconfigurado (Figura 5 A, B e C). De acordo com Ahammad et al. (2003), concentrações de sacarose acima de 0,5 M associado ao metanol podem provocar ruptura do vitelo provavelmente em função do desequilíbrio osmótico. Este fato pode estar relacionado com os resultados do presente experimento que, ao se utilizar concentrações maiores de sacarose 1,0 M (34%) associado a 9% de metanol, todos os embriões apresentaram-se com vitelo totalmente destruído e blastoderme completamente danificada (Figura 6 A, B e C).

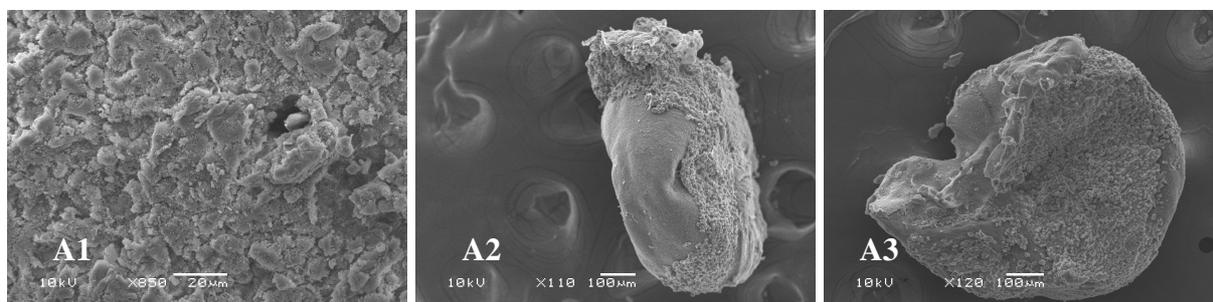


Figura 2 – Eletromicrografia de varredura de embriões de pacu (*P. mesopotamicus*) após congelação e descongelação sem crioprotetor; A 1 – blastoderme com células danificadas; A 2 – embrião com vitelo desconfigurado e blastoderme totalmente danificada; A 3 – embrião com vitelo destruído e blastoderme danificada.

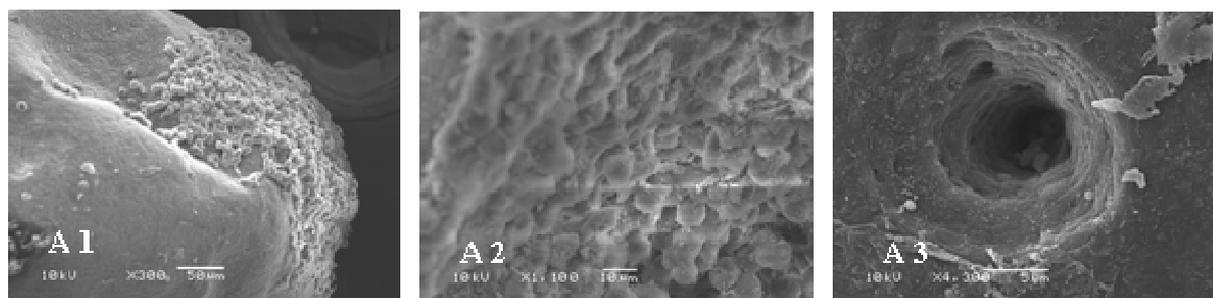


Figura 3 – Eletromicrografia de varredura de embriões de pacu (*P. mesopotamicus*) após congelação e descongelação utilizando solução crioprotetora contendo 8,5% de sacarose associada a 9% de metanol; A 1 – blastoderme com células danificadas e vitelo desconfigurado; A 2 – células embrionárias; A 3 – micrósporo do córion, danificado provavelmente pelo influxo e efluxo do crioprotetor e água.



Figura 4 – Eletromicrografia de varredura de embriões de pacu (*P. mesopotamicus*) após congelação e descongelação utilizando solução crioprotetora contendo 17% de sacarose associada a 9% de metanol; A 1 – embrião com vitelo aparentemente intacto e blastoderme danificada; A 2 – embrião hidratado com córion intacto; A 3 – camada sincicial do vitelo aparentemente danificada.

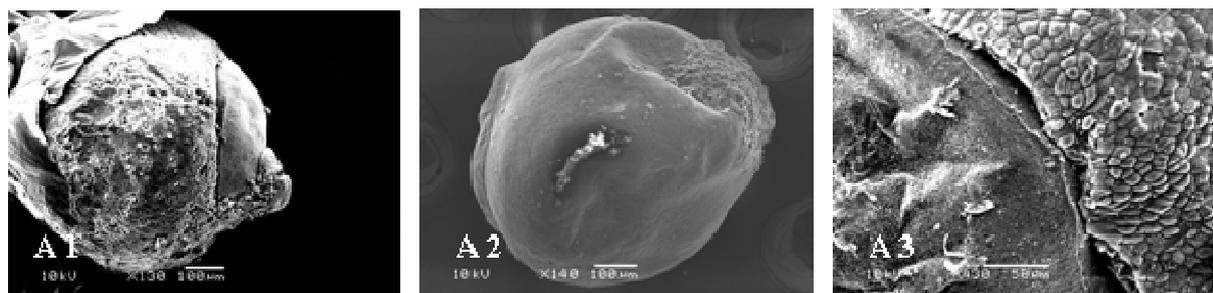


Figura 5 – Eletromicrografia de varredura de embriões de pacu (*P. mesopotamicus*) após congelação e descongelação utilizando solução crioprotetora contendo 25,6% de sacarose associada a 9% de metanol; A 1 – embrião com blastoderme danificado e córion destruído; A 2 – vitelo desconfigurado, com blastoderme destruído; A 3 – camada sincicial do vitelo aparentemente danificada.

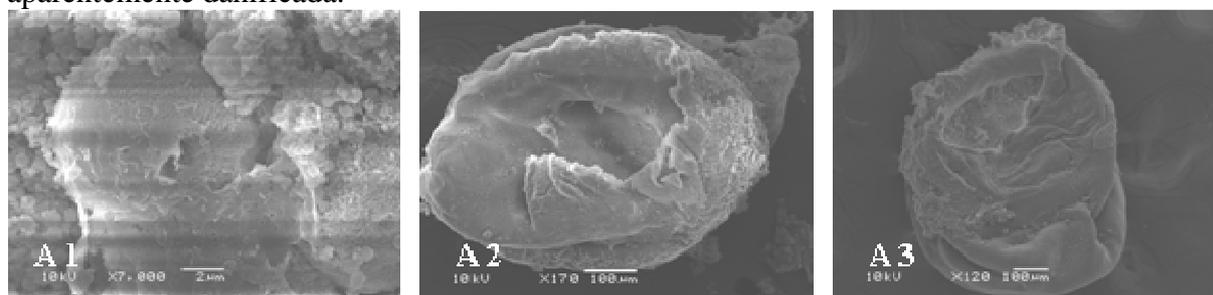


Figura 6 – Eletromicrografia de varredura de embriões de pacu (*P. mesopotamicus*) após congelação e descongelação utilizando solução crioprotetora contendo 34,2 % de sacarose associada a 9% de metanol; A 1 – células blastoderme destruídas; A 2 – vitelo destruído, presença de pequenas partes do blastoderme; A 3 – vitelo totalmente destruído, com presença de grânulos de extravasado.

A criopreservação de ovos e embriões de peixes tem apresentado vários problemas associados com as injúrias causadas durante os processos de congelação e descongelação e quatro características têm sido identificadas como possíveis responsáveis pelo insucesso. A maioria dos ovos de peixes são maiores que 1mm de diâmetro, resultando em uma baixa taxa área/volume, tendo como consequência, a redução da taxa de fluxo de água e dos crioprotetores durante os passos para criopreservação; a grande quantidade de vitelo e as diferentes características osmóticas dos vários compartimentos do embrião; os ovos de peixes apresentam um complexo sistema de membranas, sendo que algumas destas possuem baixa permeabilidade; e a alta sensibilidade ao frio (Billard & Zhang, 2000).

Neste experimento foi demonstrado que através de eletromicrografia de varredura, pode-se identificar as principais injúrias causadas pela congelação e, pode-se ainda, verificar a diferença na manutenção da integridade, que provavelmente tenha ocorrido em função das diferentes concentrações de sacarose utilizada.

### Conclusão

As diferentes concentrações de sacarose associadas ao metanol não evitaram a formação de cristais de gelo, provavelmente, em todos os tratamentos, havendo deformações embrionárias durante processo de congelação e descongelação, inviabilizando os embriões de *P. mesopotamicus*. Porém, há indício de que o tratamento com 17% de sacarose e 9% de metanol gerou menores alterações estruturais aos embriões, o que pode ser um fato promissor para novos estudos.

### Referência

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

AHAMMAD, M.M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B.B. Hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryo stored at 4 and  $-2^{\circ}\text{C}$  in different concentration of methanol and sucrose. **Theriogenology**, Amsterdam, v.60, n.8, p.1409-1422, 2003.

BILLARD R.; ZHANG, T. Techniques of genetic resource banking in fish. In: TAYLOR, A. FRANCIS, R. **Cryobanking the genetic resource. Wildlife conservation for the future?** London: 2001. p. 145-170.

CASTANHOLLI, N.; ZUIM, S.M.F. Consolidação do conhecimento adquirido sobre o pacu, *Colossoma mitrei* – Berg, 1895. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v.5, p.1–2, 1985.

DENNISTON, R.; MICHELET, S.; GODKE, R.A. Principles of cryopreservation. In. TIERSCH, T.R. e MAZIK, P.M. **Cryopreservation in aquatic species. World Aquaculture Society**. Baton Rouge, 2000, cap.2, p.59-74

GALMAN, O.R.; AVTALION, R.R. Further study of the embryonic development of *Oreochromis niloticus* (Ciclidae, teleostei) using scanning electro microscopy. **Journal of fish Biology**, San Francisco v.34. p.653-664. 1989.

HAGEDORN, M.; HSU, E.; KLEINHANS, F.W.; WILDT, D.E. New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation. **Cryobiology**, San Diego, v.34, n.4, p.335-347, 1997

HARVEY, B. Cooling of embryonic cells, isolated blastoderms, and intact embryos of the zebra fish *Brachydanio rerio* to minus -196 Celsius. **Cryobiology**, San Diego, v.20, n.5, p.440-447, 1983.

JANIK, M.; KLEINHANS, F.W.; HAGEDORN, M. Overcoming a permeability by microinjecting cryoprotectants into zebrafish embryo (*Brachidanio rerio*). **Cryobiology**, San Diego, v.41, p.25-34, 2000.

LAHNSTEINER F. The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Dario rerio*) embryo. **Theriogenology**, Amsterdan, v.69, p.384-396, 2008.

LIMA, R.V.A.; BERNARDINO, G.; VAL-SELLA, M.V.; FAVA-DE-. MORAES, F.; SCHEMY, R. A.; BORELLA, M. I. Tecido germinativo ovariano e ciclo reprodutivo de pacus (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) mantidos em cativeiro. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v.4, p.1-46, 1991

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

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, Amsterdan, v.35, n.1, p.109-124, 1991.

NINHAUS-SILVEIRA, A; FORESTI, F.; AZEVEDO, A.; AGOSTINHO, C.A. Structural and ultrastructural characteristics of the yolk syncytial layer in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Teleostei; Prochilodontidae). **Zygote**, New York, p.267–271, 2007.

NINHAUS-SILVEIRA, A. FORESTI, F.; AZEVEDO, A.; AGOSTINHO, C.A; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Cryogenic preservation of embryos of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae) **Zygote**, New York, p.1-11, 2008.

RAWSON, D.M.; ZHANG, T.; KALICHARAN, D.; JONGEBLOED L. Field emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy studies of the chorion, plasma membrane and syncytial layers of the gastrula-stage embryo of the zebrafish *Brachydanio rerio*: a consideration of the structural and functional relationship with respect to cryoprotectant penetration. **Aquaculture Research**, San Francisco, v.31, p.325-336, 2000.

REICHENBACH, H.D.; OLIVEIRA, L.; LIMA, P.F.; SANTOS-FILHO, A.S.; ANDRADE, J.C.O. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: GONSALVES P. B.;

FIGUEIREDO J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas: aplicação à reprodução animal**. Ed Varela, São Paulo-SP. Cap. 8, 2001. p.127-178.

SHARDO, J.D. Comparative embryology of teleostean fishes. I development and staging of the American shad, *Alosa sapidissima*. **Journal of Morphology**. Hoboken, v. 225. p. 125-167. 1995.

SILVA, J.A.; BARROSO, R.M.; BENEVIDES, F.I.M. Utilização de extrato cru de hipófise de frangos (*Gallus domesticus*) como indutor de desova em Curimatá (*Prochilodus scrofa*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.21, p.30–32, 1997.

STREIT JR. D.P.; BENITIS, C.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R.P.; SAKAGUTI, E.S.; CALDIERI, R.F. Sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criopreservado com diluentes utilizados para sêmen de suínos. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.7, n.3, p.289-297, 2006.

STREIT Jr., D.P.; DIGMAYER, M.; RIBEIRO, R.P.; SIROL, R.N.; MORAES, G.V.; GALO, J.M. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, p.1199-1202, 2007

URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTO, B; GOMES, L.C. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM. 2005. p.225-246.

WILDT, D.E.; SEAL, U.S.; RALL, W.F. Genetic resource banks and reproductive technology for wildlife canservation. In: CLOUD, J.G.; THORGAARD, G.H. **Genetic conservation of salmonid fish**, Moscow, 1993. p.159-173.

WILLADSEN S.M.; POLGE, C.; ROWSON, L.E.A. Deep-Freezing of sheep embryos. **Journal of Reproduction and fertility**, Cambridge, v.46, p.151-154, 1976.

WILLADSEN S.M.; POLGE, C.; ROWSON, L.E.A. The viability of deep fronze cow embryos. **Journal of Reproduction and fertility**, Cambridge, v.46, p.391-393, 1978.  
WOELDERS, H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. **The Veterinary Quarterly**, Bilthoven, v.19, p.135-138, 1997.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão**. Tradução de chama, V.L.M. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq, 1983. p. 225.

ZHANG, T.; RAWSON, D.M. Permeability of the vitelline membrane of 1-cell and 6-somite stage zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos to water and methanol. **Cryobiology**, San Diego, v.37, p.13-21, 1998.

ZHANG, T.; RAWSON, D.M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryo. **Cryobiology**, San Diego, v.33, p.1-13, 1996.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)