

CONSERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE PACU (*Piaractus mesopotamicus*)

Danilo P. Streit Jr. *, Ricardo P. Ribeiro, Rodolfo N. Sirol, Gentil V. Moraes,
Carlos Oliveira, Freddy Poblete Mora e Enio Lupichinski

*Dep. Zootecnia, Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),
Av. Bento Gonçalves, 7712 - Porto Alegre, RS. Email: danilo.streit@ufrgs.br

Resumo

Em função de não haver um protocolo que permita criopreservar embriões de peixes, experimentos com *Piaractus mesopotamicus* foram conduzidos com o objetivo de testar meios diluidores, crioprotetores e temperaturas de resfriamento. Vinte e quatro mil embriões foram submetidos aos crioprotetores metanol e DMSO, além do grupo controle (sem crioprotetor) e em seguida expostos durante quatro horas, as temperaturas, 7; 5; -2 e -7°C. Em outro experimento conduzido utilizou-se 2.400 embriões em estágio de pós-gastrula, submetidos a sete diferentes tratamentos mais um controle e alocados a uma temperatura de -8°C durante seis horas. Durante quatro horas na temperatura de resfriamento mais elevada testada, 7°C a solução com metanol proporcionou mais de 68% de taxa de eclosão, superior ($P < 0,05$) a solução com DMSO (47,65%) e o controle (46,98%). Já na temperatura de -7°C a taxa de eclosão da solução com DMSO, foi menor, 13,96% ($P < 0,05$) em relação a solução em que se utilizou metanol, 47,4% e o controle, 52,4%. O crioprotetor etileno-glicol revelou-se inapropriado para o resfriamento dos embriões a -8°C durante seis horas, assim como a geléia real. A substituição de 50% da sacarose por glicose, não produziu bons resultados. Por outro lado, a combinação de 10% de metanol com 5% de sacarose, possibilitou 69,24% de larvas eclodidas, sendo recomendada esta solução para o resfriamento a -8°C de embriões de *P. mesopotamicus*.

Introdução

A criopreservação ainda não é uma técnica viável para embriões de peixes, devido a inúmeros fatores como: sensibilidade ao frio do embrião, diferente permeabilidade das membranas e quantidade de vitelo (Valdez Jr. et al., 2006). Por outro lado, pesquisas têm mostrado que o resfriamento de embriões de peixe está mais próximo de ter um protocolo estabelecido (Ahammad et al., 2002). Soluções crioprotetoras são indispensáveis para submeter o embrião a temperaturas abaixo de 0°. Para Denniston et al. (2000) o desempenho dos agentes crioprotetores intracelulares (metanol, DMSO, glicerol, etileno-glicol) pode ser otimizado associando-os a crioprotetores de ação extracelular (glicose, sacarose, trehalose).

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é uma espécie sul-americana que apresenta rusticidade, crescimento precoce e hábito alimentar onívoro. Esta espécie oferece excelentes características zootécnicas para o cultivo, têm grande aceitação na piscicultura brasileira, caracterizando-se como um dos principais peixes cultivados no Brasil (Castagnolli, 1992).

O objetivo destes estudos foi propor um protocolo de resfriamento de embriões de peixes, utilizando o *P. mesopotamicus* foi avaliar o desempenho dos embriões em diferentes soluções crioprotetoras em diferentes temperaturas.

Material e Métodos

Este trabalho foi desenvolvido no mês de fevereiro de 2006, na Estação de Hidrologia e Aqüicultura da DUKE ENERGY - *Geração Paranapanema*, S.A, no município de Salto Grande, SP, em parceria com o laboratório de reprodução animal da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Experimento 1

Doze desovas de pacu (*P. mesopotamicus*) foram selecionadas e fertilizadas com sêmen de animais que também estavam estocados em tanques de concreto de 1.000 m². Os pacus (machos e fêmeas) selecionados na estocagem apresentavam características reprodutivas secundárias de peixes migradores como abdômen abaulado e macio, com orifício urogenital avermelhado e intumescido e, os machos liberavam sêmen com uma leve compressão no abdômen. Após a seleção, levou-se os animais ao laboratório para indução hormonal com extrato de hipófise.

As soluções crioprotetoras foram preparadas, diluindo-se os crioprotetores DMSO e metanol em concentração de 10% em água destilada. Cada solução foi previamente preparada em beakers de 20 ml, com 10 ml de solução, devidamente identificadas.

De cada uma das 12 desovas selecionou-se, 2000 embriões de pacu em estágio pós o fechamento do blastopóro, (10 horas de incubação), que estavam alocados em incubadoras de 7 L d'água, à temperatura de 28±1°C, com fluxo contínuo de água de 5 L/minuto. Com uma pequena peneira plástica colheram-se 170 embriões drenados, colocados em copos plásticos com 20 ml de soluções crioprotetoras de metanol e DMSO, além do controle (somente água). Os copos plásticos contendo os embriões foram levados ao refrigerador previamente ajustado as temperaturas de 7, 5, -2 e -7°C, em um total de 12 tratamentos. Após quatro horas no refrigerador retiraram-se os embriões, drenando a solução crioprotetora e, imediatamente, levou-se às incubadoras experimentais (2,5 L d'água, capacidade) para completar o seu desenvolvimento, até ocorrer a eclosão.

A partir da eclosão dos ovos estabeleceu-se um período de duas horas para avaliação dos tratamentos. Então, retirou-se todas as larvas e ovos gorados para avaliação. A temperatura de incubação durante o desenvolvimento embrionário foi de 28±1°C, mantido por um fluxo constante de água de 5 l/s que alimentava as incubadoras experimentais. A avaliação consistiu em definir o número de ovos gorados, larvas que eclodiram viáveis, larvas mortas e defeituosas. Consideraram-se larvas viáveis aquelas que apresentavam movimentação regular após a eclosão e embriões defeituosos aqueles que deram origem a larvas que não apresentavam movimentação vigorosa ao se deslocar, não conseguiram sair inteiramente do ovo ou apresentavam deformidade na notocorda. Os ovos gorados foram aqueles em que os embriões não evoluíram à larvas. E, por fim, larvas mortas, embriões que se desenvolveram, eclodiram, mas estavam mortas no momento da contagem.

Experimento 2

Selecionou-se 2400 embriões viáveis de pacu em estágio de pós-gástrula, que também estavam em incubadoras cônicas de 7 L com fluxo de 5 L/minutos. Sete tratamentos foram testados com três repetições por tratamento, mais um controle (embriões incubados em água

sem passar pelo resfriamento). Os crioprotetores utilizados foram: extracelular - glicose, metanol e geléia real e os intracelulares - metanol e etileno-glicol em diferentes proporções.

Os 2.400 embriões, a temperatura ambiente de 28°C subdividiu-se em 24 novas parcelas com 100 embriões cada. Em seguida cada uma destas parcelas de 100 embriões foram alocadas em 24 diferentes tubos de vidro (três tubos por solução e para o controle) onde havia 20 mL das sete diferentes soluções e a água para o controle.

Com exceção dos três tubos do controle, todos os outros (21 tubos) foram imediatamente vedados e acondicionados em um recipiente que possuía água a uma temperatura de 15°C durante 10 minutos. Em seguida estes 21 tubos, foram alocados em outro recipiente com água a uma temperatura de 5°C durante 10 minutos para em seguida serem acondicionados em um congelador à temperatura de -8°C, durante seis horas. Após seis horas, retirou-se as amostras do congelador, drenou-se as soluções e, imediatamente, levou-se os embriões, para incubadoras de 7 L d'água, onde já estava o controle, para completar o seu desenvolvimento até ocorrer a eclosão das larvas.

A partir do início da eclosão das larvas do controle (18 horas) estabeleceu-se um período de nove horas para avaliação dos demais tratamentos. Então, retirou-se todas as larvas e ovos gorados das incubadoras para avaliação.

O delineamento experimental no experimento 1 foi inteiramente ao acaso, sendo 12 tratamentos arranjados em um fatorial de três soluções (2 crioprotetores e o controle), expostos em quatro temperaturas (3x4), em 12 repetições no tempo. Cada tratamento foi conduzido, independentemente um do outro, sendo considerado a desova fertilizada como unidade experimental. O delineamento experimental do experimento 2 foi inteiramente ao acaso, onde cada tratamento (T1; T2; T3; T4; T5; T6; T7 e o controle) foi dividido em três repetições e cada repetição foi considerada uma unidade experimental.

Para as variáveis respostas, larvas viáveis, mortas e defeituosas, além de ovos gorados, foram analisados seguindo o modelo descrito a seguir: $Y_{ijk} = \mu + S_i + B_j + SB_{ij} + \epsilon_{ijk}$; Onde: Y_{ijk} = observação do embrião (k) exposto ao crioprotetor (i) na temperatura (j); μ = constante geral; S_i = efeito da solução crioprotetora (i) nos embriões; B_j = efeito da temperatura (j) nos embriões; SB_{ij} = interação entre a solução crioprotetora (i) com a temperatura (j) nos embriões; ϵ_{ijk} = erro aleatório associado ao embrião (k), submetido a soluções crioprotetora (i) na temperatura (j);

Para as análises estatísticas utilizou-se o procedimento GENMOD do SAS 1992 (*Statistical Analysis System*) que implementou a metodologia de MODELOS LINEARES GENERALIZADOS. Considerou-se que os erros possuíam distribuição de probabilidade de POISSON, com função de ligação logarítmica.

Resultado e Discussão

Experimento 1

Solução de resfriamento em que o metanol foi utilizado, mostrou maior proteção para os embriões quando expostos a temperatura de 7°C e na -7°C em relação à solução que continha DMSO como crioprotetor. Todavia, na temperatura de -7°C, não houve diferença ($P > 0,05$) na taxa de eclosão quando dos embriões que estavam submetidos a solução com

metanol em relação ao controle. Nas duas outras temperaturas utilizadas 5 e -2°C não houve diferença (Tabela 1).

Tabela 1. Média e erro padrão da taxa de eclosão de larvas de *P. mesopotamicus* submetidos as temperaturas de 7, 5, -2 e -7°C com soluções crioprotetoras com DMSO e metanol e somente água (controle).

	Temperatura			
	7°C	5°C	-2°C	-7°C
Controle	46,98±4,49b	55,27±4,49	52,24±4,49	52,43±4,49a
DMSO	47,65±4,49b	61,22±4,49	54,76±4,49	13,96±4,49b
Metanol	68,18±4,49a	56,52±4,49	54,65±4,49	47,4±4,49a

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05).

A taxa de eclosão maior das larvas em que os embriões foram expostos ao crioprotetor metanol na temperatura de 7°C no presente estudo, provavelmente esteja relacionado a menor toxidez deste crioprotetor em relação ao DMSO. A toxidez dos crioprotetores varia em função da espécie do embrião submetido ao tratamento (Cabrita et al., 2003). A utilização como crioprotetor do metanol tem se propagado em função de sua baixa toxicidade e boa permeabilidade na membrana celular (Hagedorn et al., 1997). A taxa de eclosão de larvas de *Cyprinus carpio* foi de até 90% no estudo de Urbányi et al. (1997) após terem expostos os embriões desta espécie a 4,05% (concentração v/v) do crioprotetor metanol. No presente estudo a concentração utilizada foi de 10% (v/v). Concentração está considerada ideal por Hubálek et al. (2003) para compor a solução de conservação. Para Wolfe & Bryant (2001), se o DMSO tem como principal virtude a permeação rápida para o interior da membrana plasmática, especialmente em baixas temperaturas, como inconveniente tem a capacidade de causar alterações na membrana, as quais danificam e inviabilizam as células, tornando especialmente tóxico.

Experimento 2

Não houve diferença significativa (P>0,05) na taxa de eclosão entre o grupo controle (T8) e o tratamento T1 onde foi utilizada sacarose associada com o metanol, porém em relação aos demais tratamentos o controle apresentou um taxa de eclosão significativamente maior (P<0,05) (Tabela 1).

Tabela 1. Média e erro padrão da taxa de eclosão de larvas de *P. mesopotamicus*, após os embriões terem sido submetidos a diferentes tratamentos e expostos por seis horas à uma temperatura de -8°C, além do controle.

	Tratamento							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	
T.de eclosão (%)	69,24± 0,55a	0,0± 0,0e	1,99± 0,45d	0,0± 0,0e	18,25± 0,91b	0,0± 0,0e	6,0± 0,67c	79,99± 0,86a

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si (P<0,05)

De um modo geral, nas soluções em que se utilizou o metanol como crioprotetor intracelular (T1; T3 e T5) a taxa de eclosão foi superior se comparada com as soluções onde o crioprotetor intracelular foi o etileno-glicol (T2; T4 e T6). A eficiência do metanol como

crioprotetor intracelular, pode ser observada no estudo de Ahammad et al. (2003) com embriões de rohu (*Labeo rohita*), onde estabeleceram como ideais as concentrações deste crioprotetor em 9,6; 6,4 e 4,8% nas temperaturas de -4, 0 e 4°C, obtendo 48,00; 95,00 e 74,00% de taxa de eclosão. Quando embriões de *Danio rerio*, expostos a uma temperatura de 1 e -5°C em até uma hora, Zhang et al. (2003) atribuíram a proteção contras às injúrias provocadas pelo frio, à propriedade do metanol em não deixar alterar a conformação físico-química da camada fosfolipídica da membrana celular do embrião. Esta hipótese pode ser aplicada para os embriões de *P. mesopotamicus* neste estudo e, está baseada no fato argumentado por Farkas et al. (2001), da necessidade da manutenção estrutural e funcional da camada fosfolipídica quando a estrutura está sendo exposta a uma nova temperatura.

A toxidez do crioprotetor etileno-glicol é reforçada pelo resultado obtido no tratamento T7, onde não houve adição de crioprotetor e sim a utilização apenas de água, resultando em uma taxa de eclosão das larvas de 6,00%. Desse modo, a hipótese levantada para a não ocorrência de eclosão nos tratamentos T2; T4 e T6 onde utilizou-se o crioprotetor etileno-glicol, pode estar relacionado à interferência deste crioprotetor no metabolismo do embrião. O que poderia ter provocado um desestruturação celular e por conseqüência a morte do embrião. Pois de acordo com Kusuda et al. (2002) a susceptibilidade dos embriões dos embriões ocorre em função da degeneração celular e das proteínas da membrana nuclear, devido a desidratação e aumento na concentração salina em decorrência do contato com o crioprotetor.

A substituição parcial da sacarose por outro crioprotetor extracelular, no caso a glicose associada ao metanol (T5), resultou em apenas 18,25% de taxa de eclosão, não se mostrou promissora, se comparado, por exemplo com a solução em que só foi utilizada a sacarose como crioprotetor extracelular (T1). Os açúcares, para Holt (2000) desempenham um papel importante na solução crioprotetora, o da manutenção da pressão osmótica. De acordo com Rall (1987) a sacarose, que é um oligossacarídeo tem o efeito adicional de proteção celular sobre outros açúcares de cadeia mais simples, como a glicose. Pois provoca uma desidratação nos embriões, reduzindo a quantidade de água no citoplasma da célula e desta forma evitando a formação de cristais de gelos intracelulares.

A eficiência crioprotetora da sacarose foi otimizada quando associada ao metanol, fato este verificado quando comparou-se a taxa de eclosão do tratamento T1 com os demais tratamentos onde utilizou-se outros crioprotetores. A utilização destes dois crioprotetores tem possibilitado resultados promissores em outras espécies. 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 tratados com metanol (1, 2 e 3M), associados com sacarose (0,5M). Estes autores concluíram que a adição de sacarose no metanol (1 e 2M) foi essencial para a sobrevivência dos embriões de *Cirrhinus mrigala*.

A utilização da geléia real, nos tratamentos T3 e T4 como agente crioprotetor para embriões de peixes, foi motivada por sua propriedade em reduzir injurias provocadas pelo frio em embriões de mamíferos Visintin et al. (2000). Todavia, para os embriões de *P. mesopotamicus* esta ação crioprotetora da geléia real não foi verificada. Isto pode ser atribuído ao fato da concentração de 1,0% de geléia-real utilizada para compor a solução crioprotetora neste estudo, ter produzido um efeito negativo na taxa de eclosão. Este efeito pode ser notado, por exemplo quando comparou-se a taxa de eclosão do tratamento T3

(1,99%) onde a geléia-real estava associada a metanol e a sacarose com o T1 (69,24%) em que a geléia-real estava ausente da solução crioprotetora.

Conclusão

Os embriões de *P. mesopotamicus* suportam temperatura de até -7°C durante quatro horas com a presença de metanol ou sem a presença de nenhuma solução crioprotetora. Porém, quando a temperatura passa para -8°C durante seis horas a associação do crioprotetor intracelular metanol com um extracelular, sacarose é eficiente para manter viáveis os embriões de *P. mesopotamicus*.

Referências

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

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

AHAMMAD, M.M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B.B. Stage-dependent hatching responses of rohu (*Labeo rohita*) embryos to different concentrations of cryoprotectants and temperatures. *Cryobiology*, v.46, n.1, p.2-16, 2003.

CABRITA, E., ROBLES, V., CHEREGUINI, O., WALLACE, J.C., HERRÁEZ, M.P. Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). *Cryobiology*, v.47, n.3, p.204-213, 2003.

CASTAGNOLLI, N. Espécies exóticas próprias para a piscicultura. In: CASTAGNOLLI, N. (Ed.). Piscicultura de água doce. Jaboticabal: FUNEP, 1992. p.71-96.

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

FARKAS, T.; FODOR, E.; KITAJKA, K.; HALVER, J.E. Response of fish membranes to environmental temperature. *Aquaculture Research*, v.32, n.8, p.645-655, 2001.

HAGEDORN, M. et al. Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. *Cryobiology*, San Diego, v.34, n.3, p.251-263, 1997.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, v.63, n.1-2, p.3-22, 2000.

HUBALÉK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, v.46, n.1, p.205-229, 2003.

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

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*, v.55, n.8, p.1719-1731, 2001.

RALL, W.F.; FAHY, G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*. v.313, p.573-575, 1985.

SAS Institute Inc. SAS technical report. Release 6.07. Cary: NC, 1992.

URBÁNYI, B. et al. Cryopreservation of sperm and eggs of sharptooth catfish. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. *Cryopreservation in aquatic species*. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000, cap.3, p.188-198.

VALDEZ Jr., D.M.; HARA, T.; MIYAMOTO, A.; SEKI, S.; IN, B.; KASAI, M.; EDASHIGE, K. Expression of aquaporin-3 improves the permeability to water and cryoprotectants of immature oocytes in the medaka (*Oryzias latipes*). *Cryobiology*, v.53, n.2, p.160-168, 2006.

VISINTIN, J.A.; GARCIA, J.F.; PANTANO, T; D'ÁVILA-ASSUMPÇÃO, M.E.O. Cryopreservation of mouse morulae in glycerol, sucrose and honeybee royal jelly. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*, v.37, n.4, p.307-311, 2000.

ZHANG, T; RAWSON, D.M.; MORRIS, G.J. Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Aquatic and Living Resource*, v.6, n.2, p.145-153, 1993.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. *International Journal of Refrigeration*, v.24, n.5, p.438-450, 2001.