

## **RESFRIAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE PEIXES**

(Cooling and cryopreservation of fish embryos)

**Nathalie Ommundsen PESSOA \*<sup>1</sup>, Miriam Luzia Nogueira Martins de SOUSA<sup>1</sup>, Janaina Serra Azul Monteiro EVANGELISTA<sup>2</sup>, Aldeney Andrade SOARES FILHO<sup>3</sup>, Célia Maria de Souza SAMPAIO<sup>1</sup>**

1. Universidade Estadual do Ceará (UECE). Centro de Ciências da Saúde. Curso de Ciências Biológicas. Laboratório de Carcinicultura. 2. UECE. Faculdade de Veterinária. Laboratório de Histologia de Efeitos Causados por Venenos de Serpentes e Plantas. 3. UECE. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Engenharia de Pesca. Laboratório de Bioecologia.

### **RESUMO**

Nas últimas décadas, as populações naturais de peixes têm diminuído devido à degradação ambiental e pesca excessiva, o qual precipita a descaracterização e o desaparecimento do habitat natural e dos organismos que nele vivem. Isso tem suscitado um grande interesse na criação de bancos de genes para organismos aquáticos selvagens. Visando suprir esse desequilíbrio ecológico e aumentar os benefícios econômicos, a piscicultura tem gerado inúmeros trabalhos no âmbito de técnicas de cultivo, controle de doenças, avaliação dos gametas produzidos em cativeiro e técnicas para congelamento seminal e de embriões. A criopreservação de sêmen de peixes tem sido pesquisada, no entanto ainda é necessário otimizar protocolos de resfriamento para preservação de embriões e escolher o crioprotetor ideal para a espécie.

**PALAVRAS-CHAVE:** Germoplasma. Resfriamento. Teleósteos.

### **ABSTRACT**

In recent decades, the natural fish population have declines due to overfishing and environmental degradation, wich precipitates the disappearance of natural habitat and his living organisms. This situation increased the interest for the creation of gene banks for wild aquatic organism. The fisherie constantly generates numerous research about techniques to control diseases, evaluation of gametes quality produced in captivity and freezing process to sperm end embryos. Sperm cryopreservation has been investigates with success, however it is necessary optimize cooling protocol for embryos. The results of this reviews show the need more research to choose a optimal cryoprotectant for the fish species for embryos.

**KEYWORDS:** Germoplasm. Cooling. Teleost.

### **INTRODUÇÃO**

Os declínios nos estoques naturais de peixe no mundo em grande parte são resultantes da exploração excessiva e mudanças antrópicas no

meio ambiente (FAO, 2011). Isso tem suscitado um grande interesse na criação de bancos de genes para organismos aquáticos selvagens (HARVEY, 1996).

A estratégia ideal para a conservação de espécies ameaçadas é pela proteção e restauração de seus habitats nativos. Infelizmente, isso requer muito dinheiro e tempo, além de ser um processo lento. Uma alternativa é estabelecer bancos de

---

\*Endereço de correspondência:

Laboratório de Carcinicultura. Centro de Ciências da Saúde.. Universidade Estadual do Ceará (UECE).

email: nathalieop@gmail.com

genes *ex situ* resfriados ou criopreservados, o que garantiria a manutenção das populações de peixe geneticamente puras, enquanto as condições de habitat para o repovoamento é realizado. Além disso, o rápido crescimento da indústria da aquicultura tem promovido a necessidade de produção rápida e a entrega de espécimes, o que poderia ser feito de maneira mais eficiente com o armazenamento criogênico de gametas e embriões (DONALDSON, 1997).

## RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO DE EMBRIÕES

Cientistas tem estudado a criopreservação de sêmen de importantes peixes de água doce da América do Sul, tais como: *Brycon amazonicus* (NINHAUS-SILVEIRA et al, 2006); *Prochilus lineatus* (MURGAS et al., 2007), e *Brycon orbinnyanus* (MURGAS et al., 2004; VIVEIROS e GODINHO, 2008). No entanto, também é necessário otimizar protocolos de resfriamento para preservação de embriões.

Desde 1970, a criopreservação de embriões tem sido aplicada com sucesso em algumas espécies de mamíferos (DOBRINSKY, 2002) e alguns invertebrados marinhos, como mariscos (CHAO et al., 1997), ouriços do mar (ASAHINA & TAKAHASHI, 1979), e poliquetas (OLIVE e WANG, 1997). Muitos estudos sobre criopreservação de embriões de peixes foram realizados em zebrafish (LIU et al., 1998; HAGEDORN et al., 2004). Além disso, nos últimos anos, com o rápido desenvolvimento de peixes em aquicultura marinha, algumas tentativas de criopreservação de embriões foram realizadas, especialmente naquelas com grande valor comercial, como *Paralichthys olivaceus* (ZHANG et al., 2003; CHEN & TIAN, 2005), *Scophthalmus maximus* (CABRITA et al., 2003; ROBLES et al., 2003), *Sparus aurata* (BEIRAO

et al., 2006; CABRITA et al., 2006) e *Pagrus major* (DING e XIAO, 2007)

O desenvolvimento de embriões de peixes é influenciado pela temperatura. Dentro dos níveis de tolerância, em baixas temperaturas o desenvolvimento é mais lento e acelera com alta temperatura (ZHANG e RAWSON, 1995).

Os principais problemas associados à criopreservação de embriões de peixe são a redução da permeabilidade das membranas à água e aos crioprotetores, bem como a sensibilidade do embrião ao frio (HAGEDORN et al., 1997). Estas características dependem da fase de desenvolvimento do embrião, por exemplo: *Oncorhynchus mykiss* (MADDOCK, 1974; HAGA, 1982) *Cyprinus carpio* (JAOUL e ROUBAUD, 1982; ROUBAUD et al., 1985) *Syngnathus scovelli* (BEGOVAC e WALLACE, 1986) *Carassius auratus* (LIU et al., 1993) e *Danio rerio* (ZHANG e RAWSON, 1995; HAGEDORN et al., 1997) quando congelados na etapa de pós-gástrula foram menos sensíveis ao frio. Em embriões de *Danio rerio*, o congelamento com a remoção do córion não afetou a susceptibilidade ao frio (HAGEDORN et al., 1997).

Lahnsteiner (2008) atribui a alta sensibilidade, ao frio nos estágios iniciais e a sua queda progressiva à medida que ocorre o desenvolvimento, aos seguintes fatores: a) a rápida diferenciação afetada pela ação dos crioprotetores; b) a não formação completa do ovo imediatamente após a fertilização assim como a dureza do córion afetando o fluxo de água e a regulação osmótica tornando os estágios ontogenéticos iniciais mais permeáveis aos crioprotetores que em outros estágios; c) nos estágios iniciais embrionários, as vias metabólicas ainda não estão completamente desenvolvidas e não impedem totalmente os efeitos tóxicos dos crioprotetores.

## DILUENTES E CRIOPROTETORES

Como no caso do sêmen, a escolha do crioprotetor varia de acordo com a espécie. Para *Oncorhynchus mykiss*, o propileno glicol 2,5M não é tóxico e protege os ovos embrionários por uma hora a -7 °C (MAISSE et al., 1998). Para *Danio rerio* o metanol permite uma proteção dos embriões por 3 horas a -5 °C (ZHANG e RAWSON, 1995) e por 1 hora a -5 °C em solução modificada de Hank e com remoção parcial de vitelo (Liu et al., 2001). Embriões de *Cyprinus carpio* podem ser mantidos por 10 horas a -5 °C em presença de dimetilsulfóxido (DMSO) (ZHANG et al., 1989) e até 7 dias a -2°C em solução de metanol e trealose (AHAMMAD et al., 2002). Os resultados obtidos nas diferentes espécies mostram que a sobrevivência diminuiu rapidamente com a temperatura baixa.

Zhang e Rawson (1996) aplicaram sem sucesso a técnica de vitrificação de embriões de *Danio rerio* onde houve formação de gelo intraembrionário, entretanto Robles et al. (2005) obtiveram bons resultados com a técnica no congelamento de embriões de *Pseudopleuronectes americanus*, espécie residente em regiões geladas do Ártico.

Embora os métodos de criopreservação de sêmen de peixe marinho e de água doce venham se consolidando, por outro lado a criopreservação de ovos e embriões tem feito pouco progresso (RAHMAN et al., 2008). Devido esse pouco avanço, as pesquisas tem se desenvolvido no sentido de avaliar a toxicidade do crioprotetor nos diferentes estágios de desenvolvimento, como na espécie *Sillago japonica*, onde os embriões apresentaram boa tolerância ao gradativo aumento de propileno glicol 20% realizado em 5 etapas (RAHMAN et al., 2008; RAHMAN et al., 2011).

Também foram avaliadas as formações de gelo intra e extracelular nos embriões de *Pagrus*

*major*, em diferentes taxas de resfriamento com metanol 10% (LI et al., 2009) e em diferentes concentrações de sacarose com metanol 9%. A adição de antibióticos no meio também afeta o estoque de embriões resfriados (Lanhsteiner, 2009), bem como, o tempo de resfriamento, conforme observado em espécies brasileiras (LOPES et al., 2011).

Foram feitas análises de toxicidade de crioprotetores em embriões resfriados de *Prochilus lineatus* em temperaturas de 0 a 5°C por 12 horas (SILVA COSTA et al, 2012) e concluiu-se que os embriões apresentam uma alta sensibilidade ao frio e que os tratamentos crioprotetores desenvolvidos não foram efetivos na proteção dos embriões contra ao frio, ocasionando médias de sobrevivência menores ou iguais ao controle do estágio e menores que o controle ambiental. Além disso, o crioprotetor Dimetilformamida (DMF) apresentou-se extremamente tóxico aos embriões de *Prochilus lineatus* em todas as fases de desenvolvimento (NINHAUS-SILVEIRA et al, 2012).

## COOSIDERAÇÕES FINAIS

A criopreservação e o resfriamento de embriões de peixes são técnicas utilizadas como ferramentas para a constituição de bancos genéticos em programas de piscicultura e conservação de espécies selvagens ou ameaçadas ou, ainda, de importância econocômica. Entretanto, os resultados, mostram que há necessidade de escolher o crioprotetor ideal para peixes, tanto para a criopreservação de sêmen como a de embriões.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, p.114–121, 2002.
- ASAHINA E., TAKAHASHI T., Cryopreservation of sea urchin embryos and sperm, **Development, Growth & Differentiation** v.21, p.423–430, 1979.
- BEGOVAC PC, WALLACE RC. Ovary of the pipefish, *Syngnathus scovelli*. **J Morphology** v.193, p.117–133, 1987.
- BEIRAO J., ROBLES V., HERRAEZ M.P., SARASQUETE C., DINIS M.T., CABRITA E., Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos, **Aquaculture** v.261, p.897–903, 2006.
- BLUME, H.; MARQUES JR., A.P.V. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.18, p.97-104, 1994.
- 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, p.204–213, 2003.
- 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.
- CHAO N.H., LIN T.T., CHEN Y.J., HSU H.W., ILIAO.C., Cryopreservation of late embryos and early larvae in the oyster and hard clam, **Aquaculture** v.155, p.31–44, 1997.
- CHEN S.L., TIAN Y.S., Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification, **Theriogenology** v.63, p.1207–1219, 2005.
- CRUZ, P.; PARDO, S.; ARIAS, J.; LOMBO, P.; LOMBO, D.; PARDO, J. Cryopreservation of yamú *Brycon siebenthalae* milt. **Jour. World Aquac. Soc.**, v.35, n.4, p.529-534, 2004.
- DING F.H., XIAO Z.Z., LI J., Preliminary studies on the vitrification of red sea bream (*Pagrus major*) embryos, **Theriogenology** v.68, p.702–708, 2007.
- DOBRINSKY J.R., Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos, **Theriogenology** v.57, p.285–302, 2002.
- DONALDSON E.M., The role of biotechnology in sustainable aquaculture, In: J.E. BARDACH (Ed.), **Sustainable Aquaculture**, Wiley & Sons, Inc., NY, USA, 1997, pp. 101–126.
- FARIAS, J.O.; NUNES, J.F.; CARVALHO, M.A.M.; SALGUEIRO, C.C.M. Avaliação in vitro e in vivo do sêmen do Tambaqui (*Colossoma macropomum*) conservado a temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. **Rev. Cient. Prod. Animal**, v.1, n.1, p 44-58, 1999.
- FAO. Food and Agriculture Organization. **World fisheries production by capture and aquaculture, by country**. 2011.
- FORNARI, D.C. Crioconservação de embriões de Tambaqui (*Colossoma macropomum*). Universidade Estadual de Maringá, PR. 2012. 91p. (Tese de Doutorado em Zootecnia).
- HAGA, Y. On the subzero temperature preservation of fertilized eggs of rainbow trout. **Bull Jap Soc Sci Fish** v.48, p.1569–1572, 1982.
- HAGEDORN M, HSU E, KLEINHANS FW, WILDT DE. New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation. **Cryobiology** v.34, p.335–347, 1997.
- HAGEDORN M., PETERSON A., MAZUR P., KLEINHANS F.W., High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-cooling is not an option, **Cryobiology** v.49, p.181–189, 2004.
- HARVEY B., Banking fish genetic resources: the art of the possible, In: F. DiCastri, T. Younes (Eds.), **Biodiversity, Science and Development: Towards a New Partnership**, CAB International, Wallingford, UK, 1996, pp. 439–445.
- JAOUL A, ROUBAUD P. Resistance de l’oeuf de carp commune (*Cyprinus carpio* L. Cyprinidae) a des chocs thermiques chauds ou froids. **Can J Zool** v.60, p.409–19, 1982.
- LAHNSTEINER F. The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Danio*

- rerio*) embryos. **Theriogenology** v.69, p.384 – 396, 2008.
- LAHNSTEINER F. Factors affecting chilled storage of zebrafish (*Danio rerio*) embryos **Theriogenology** v.72, p.333–340, 2009.
- LI, L.L. ZHANG, Q.H., LIU, X.Z., XU Z.Z., XIAO, D.Y., MA, S.H., XU, Q.Z. XUE. Extra- and intra-cellular ice formation of red seabream (*Pagrus major*) embryos at different cooling rates **Cryobiology** v.59, p.48–53, 2009.
- LIU K, CHOU T, LIN H. Cryosurvival of goldfish embryos after subzero freezing. **Aquatic Living Resources** v.6, p.145–153, 1993.
- LIU X.H., ZHANG T., RAWSON D.M., Feasibility of vitrification of zebrafish embryos using methanol, **Cryoletters** v.19, p.309–318, 1998.
- LIU X.-H., ZHANG T., RAWSON D. M. Effect of cooling rate and partial removal of yolk on the chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology** v.55, p.1719-1731, 2001.
- LOPES T. S., ROMAGOSA E., STREIT JR D. P., RIBEIRO R. P., DIGMAYER M. Cooling of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos at various stages of development for 6 or 10 hours **Theriogenology** v.75, p.570–576, 2011.
- MADDOCK BG. A technique to prolong the incubation period of brown trout ova. **Progressive Fish Culturist** v.36, p.219 –222, 1974.
- MAISSE, G.; LABBE, C.; OGIER DE BAULNY, B.; LEVERONI, S.; HAFFRAY, P. Cryoconservation de sperme et des embryons de poissons. INRA. **Prod. Anim.**, v.11, n.1, p.57-65, 1998.
- MURGAS, L.; MILIORINI, A; FRANCISCATTO, R; MARIA, A. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. **Rev. Bras. Zootec.**, v.33, n.6, p.1361-1365, 2004.
- MURGAS, L.; MILIORINI, A; FREITAS, R; PEREIRA, J. Criopreservação de sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Rev. Bras. Zoot.**, v.36, n.3, p.526-531, 2007.
- NINHAUS-SILVEIRA, A; SILVA COSTA, R.; VELARDE, J.M.C.; SENHORINI, J.A; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; . Toxicidade de crioprotetores aos embriões de *Prochilodus lineatus*. In: V AQUACIÊNCIA, Palmas, 2012.
- NINHAUS-SILVEIRA, A.; SILVEIRA, R.V.; SENHORINI, J.A.; ALEXANDRE, J.S. DE; CHAGURI, M.P. Fertilidade do sêmen de matrinxã (*Brycon amazonicus*) criopreservado em nitrogênio líquido. **Boletim técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 19, p. 1-8, 2006
- OLIVE P.J.W., WANG W.B., Cryopreservation of *Nereis virens* (polychaeta Annelida) larvae: the mechanism of cryopreservation of a differentiated metazoan, **Cryobiology** v.34, p.284–294, 1997.
- RAHMAN M., MAJHI S.K., SUZUKI T. , MATSUKAWA S. , STRÜSSMANN C.A., TAKAI R. Suitability of cryoprotectants and impregnation protocols for embryos of Japanese whiting *Sillago japonica*. **Cryobiology** v.57, p.170–174, 2008.
- RAHMAN M., MAJHI S.K., SUZUKI T. , MATSUKAWA S., WATANABEA M., Efficiency of osmotic and chemical treatments to improve the permeation of the cryoprotectant dimethyl sulfoxide to Japanese whiting (*Sillago japonica*) embryos. **Theriogenology** v.75, p.248–255, 2011.
- ROBLES V., CABRITA E., REAL M., ÁLVAREZ R., HERRÁEZ M.P., Vitrification of turbot embryos: preliminary assays, **Cryobiology** v.47, p.30–39, 2003.
- ROBLES V., CABRITA E., FLETCHER G.L., SHEARS M.A., KING M.J., HERRAEZ M.P. Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species **Theriogenology** v.64, p.1633–1646, 2005.
- ROUBAUD P, CHAILLOU C, SJAFEI D. Variations cycliques de la toletance a un thermique froid appliqué au cours de la segmentation de lembryon de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.). **Can J Zool** v.63, p.657–663, 1985.
- SILVA COSTA, R.; VELARDE, J. M. C.; SENHORINI, J.A; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; NINHAUS-SILVEIRA, A. Resfriamento de

- embriões de peixes neotropicais. In: V AQUACIÊNCIA, Palmas, 2012.
- STREIT DP, JR RIBEIRO RP, MORAES GV, MENDES LDV, DIGMAYERM, GALO JM, POVH JA, BRACCINI NETO J. Semen of pacu (*Piaracatus mesopotamicus*) submitted to cooling over the time with different diluents. **Biociências** v.13, p.178–187, 2008.
- VIVEIROS, A.T.M.; GODINHO H.P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.34, n.2, 2008.
- ZHANG X.S., ZHAO L., HUAT.C., ZHU H.Y., *Cyprinus carpio* embryos. **Cryo Letters**, v.10, p.271-278, 1989.
- ZHANG T, RAWSON DM. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology** v.32, p.239–246, 1995.
- ZHANG T., RAWSON D.M., Feasability studies on vitrification of intact Zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology** v.33, p.1-13, 1996.
- ZHANG, Y.Z.; ZHANG, S.C.; LIU, X.Z.; XU, Y.Y.; WANG, C.L.; SAWANT, M.S.; LI, J.; CHEN, S.L. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. **Theriogenology**, v. 60, n°5, p. 989-996, 2003.