

Chilling of tambaqui (*Colossoma macropomum*) embryos at different times of storage.

Nathalie Ommundsen Pessoa¹, Janaína Serra Azul Monteiro Evangelista¹, Francisco

Gerson Mendes de Sousa Filho², Míriam Luiza Nogueira Martins de Sousa¹, Athur

Vinícius Lourenço¹, Célia Maria Souza Sampaio¹

ABSTRACT: The technique of cryopreservation of fish embryos has not efficient results yet, however, the cooling of embryos has been used with satisfactory results. The aim of this study was cooling embryos *Colossoma macropomum* subjected to a temperature of 2°C at different times of storage. Embryos were used in the following embryonic stages: blastoderm - 1.2 hours post-fertilization (hpf), epibolia - 5-hpf; closing blastopore - 8-hpf; appearance of the optic vesicle - 13 hpf. One hundred embryos, of each stage of ontogeny selected, were treated with glucose 0.5 M solution with 10% methanol, glucose 0.5 M with 10% methyl glycol and glucose 0.5 M in dimethylsulfoxide (DMSO) and cooled at 2°C for 6, 8, 10 and 12 hours. Statistical analysis was performed by ANOVA and Tukey test with 5% significance. We observed a significantly higher difference in complete development of live larvae with the group treated with methanol solution of glucose and a greater survival in the embryos at earlier developmental stages (8-hpf and 13-hpf). It is concluded, therefore, that the embryonic stages of closing blastopore (8-hpf) and appearance of the optic vesicle (13 hpf) can be considered the most recommended for use in cooling protocol of embryos of *C. macropomum* maintained for 8 hours at 2°C.

Key words: Aquaculture, fish of South America, embryonic development, cryoprotectants, larval survival, storage.

Resfriamento de embriões de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em diferentes tempos de estocagem

RESUMO: A técnica de criopreservação de embriões de peixe ainda não apresenta resultados eficientes, entretanto, o resfriamento de embriões já vem sendo utilizado com resultados satisfatórios. O objetivo desse trabalho foi realizar resfriamento de embriões de *Colossoma macropomum* submetidos à temperatura de 2° C em diferentes tempos de estocagem. Foram utilizados embriões nos seguintes estádios embrionários: blastoderme - 1,2-horas pós-fertilização (hpf), epibolia - 5-hpf ; fechamento do blastóporo - 8-hpf; aparecimento da vesícula óptica no embrião - 13-hpf. De cada fase ontogenética foram selecionados cem embriões que foram tratados com solução de glicose 0,5 M com metanol 10%, glicose 0,5 M com metilglicol 10% e glicose 0,5 M com dimetilsulfóxido (DMSO) e resfriados a 2 °C por 6, 8, 10 e 12 horas. A análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Tukey com significância de 5%. Foi observada uma diferença significativamente superior na média de larvas vivas com desenvolvimento completo no grupo tratado com solução de glicose-metanol e uma maior sobrevivência nos embriões em estádios de desenvolvimento mais adiantados (8-hpf e 13-hpf). Concluiu-se, portanto, que os estádios embrionários de fechamento de blastóporo (8-hpf) e aparecimento de vesícula óptica (13-hpf) podem ser considerados os mais recomendados para a utilização em protocolo de resfriamento de embriões de *C. macropomum* mantidos até 8 horas a 2° C.

Palavras-Chave: Aquicultura, peixes da América do Sul, crioprotetores, sobrevivência larval, estocagem.

1-Laboratório de Carcinicultura, Universidade Estadual do Ceará, UECE, Fortaleza, CE, 60740-000, Brasil, email: nathalieop@gmail.com

2- Departamento de Estatística e Matemática Aplicada, DEMA, Universidade Federal do Ceará, UFC, Fortaleza, CE, 60.455-760, Brasil

Introdução

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 & WANG 1997), além de estudos sobre criopreservação de embriões de *zebrafish* (LIU et al. 1998, HAGEDORN et al. 2004).

Além disso, nos últimos anos, com o rápido desenvolvimento da piscicultura, algumas tentativas de criopreservação de embriões foram realizadas, particularmente em espécies 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* (BEIRÃO et al., 2006; CABRITA et al., 2006) e *Pagrus major* (DING & XIAO 2007), entretanto sem resultados satisfatórios, devido a alta sensibilidade ao frio dos embriões de peixe.

LANHSTEINER (2008) atribui essa sensibilidade ao frio nos estádios 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 estádios ontogenéticos iniciais mais permeáveis aos crioprotetores que em outros estádios; e (c) nos estádios iniciais embrionários, as vias metabólicas ainda

não estão completamente desenvolvidas e não impedem totalmente os efeitos tóxicos dos crioprotetores. Sendo assim, a criopreservação de embriões de peixes ainda não é feita com eficiência, entretanto, o resfriamento de embriões pode ser uma alternativa.

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 com associação de um crioprotetor de ação intracelular com outro extracelular (HOLT 2000). Em relação ao resfriamento de embriões, já foram realizados em espécies como *Cyprinus carpio* em diferentes concentrações de solução e crioprotetor em temperaturas variando de 4 °C a -2 °C (AHMMAD et al., 2002). Estudos mais recentes (STREIT Jr et al., 2007; LOPES et al., 2011; LOPES et al.; 2012) mostraram ser possível armazenar embriões de *P. mesopotamicus* a baixas temperaturas, sem perdas significativas na taxa de eclosão, entretanto

estudos com resfriamento de embriões de teleósteos ainda são escassos.

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é um peixe migrador pertencente á ordem Characiformes, composta por espécies oriundas da bacia Amazônica e do rio Orinoco. Entre as espécies nativas brasileiras de água doce, o tambaqui representa a maior produção na aquicultura brasileira, superado somente pelas espécies exóticas tilápia (*Oreochromis niloticus*) e carpa (*C. carpio*) (IBAMA 2008).

Existem poucos relatos sobre resfriamento a temperatura negativa de embriões dessa espécie e com resfriamento a temperatura próxima de zero, esse trabalho é o primeiro realizado. O objetivo desse trabalho foi realizar resfriamento de embriões de *C. macropomum* submetidos em solução de glicose combinada a crioprotetores internos, a temperatura de 2° C em diferentes tempos de estocagem.

Material e Métodos

O presente estudo foi registrado sob nº11518562-3/73 pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA). Embriões de *Collossoma macropomum* foram coletados, em janeiro e fevereiro de 2012, no Centro de Pesquisas em Aquicultura (CPAq) do DNOCS, no município de Pentecoste, Ceará, situado a 03°45'00"S e 039°10'24"W e distante 82 km de Fortaleza.

Foi utilizado um *pool* de ovos proveniente das desovas de seis casais, resultantes da indução hormonal. Para isso, foram injetados (intramuscular) 5,5mg.kg⁻¹ de extrato bruto de pituitária de carpa(cPE; Danúbio Aquicultura, Blumenau, Santa Catarina) em duas doses (0,5 e 5,0mg.kg⁻¹), com intervalo de 12 horas para fêmeas, e 1,0mg.kg⁻¹ (dose única) para machos. Após 275 horas/grau, ocorreu a extrusão dos gametas e os ovos recém-fertilizados foram transferidas para incubadoras cônicas (18L) com fluxo contínuo de água.

A sequência de eventos ocorridos da fase de desenvolvimento do embrião até a eclosão de larvas foi acompanhada permitindo assim, avaliar como ocorria o desenvolvimento. A temperatura da água foi mantida em 27°C±1,0.

O grupo controle foi utilizado para verificar a influência da seleção de ovos viáveis, em momentos distintos da fase ontogenética, na taxa de eclosão, mesmo sem passar por tratamento de resfriamento. Este grupo foi composto por quatro tratamentos, sendo que cada um representava os seguintes estádios embrionários (LOPES et al., 2011): Tratamento controle 1: blastoderme - 1,2-horas pós-fertilização (hpf), (~64 células); Tratamento controle 2: epibolia - 5-hpf (25% movimento de epibolia); Tratamento controle 3: fechamento do blastóporo - 8-hpf (90% movimento de epibolia); Tratamento controle 4: aparecimento da vesícula óptica no embrião - 13-hpf. Para isso, foram utilizadas 12 incubadoras de 3

L, com fluxo contínuo, sem passar por solução crioprotetora até o momento de eclosão das larvas (aproximadamente 18-hpf).

Para compor o grupo tratamento, embriões viáveis nos diferentes estádios embrionários (1,2; 5; 8 e 13-hpf) foram coletados das incubadoras, sendo que cada unidade experimental foi acondicionada em tubos *vacutainer* e recebeu solução crioprotetora contendo glicose 0,5 M e metanol 10% ou glicose 0,5 M e DMSO 10% ou glicose 0,5 M e metilglicol 10%. Em seguida, estes tubos foram levados a caixas de isopor e gelo, cuja temperatura foi constantemente controlada.

Desta forma, os embriões passaram por uma curva de resfriamento, onde a temperatura caiu cerca de 0,5°C por minuto, até atingirem 2°C, sendo mantidos em quatro tempos de estocagem, 6, 8, 10 e

Os ovos viáveis selecionados foram divididos em grupo controle e grupo tratamento (resfriamento em quatro tempos de estocagem). Cada unidade experimental

12 horas. Os tubos foram retirados do refrigerador, aclimatados por cinco minutos em água a temperatura ambiente, e em seguida transferidos para incubadoras de 3 L. Cada tubo ocupou uma incubadora com fluxo de água contínuo, onde permaneceram até completar o desenvolvimento embrionário (Figura 1).

Ao completar o desenvolvimento embrionário (aproximadamente 18-hpf), tanto o grupo controle quanto os grupos tratamentos foram retirados das incubadoras para estimar o número de larvas vivas com desenvolvimento completo. Foi analisado o total de larvas vivas de embriões tratados por hora de resfriamento, pela sobrevivência nas diferentes fases ontogenéticas. Também foi avaliado o efeito dos tratamentos pelas horas de resfriamento e pelos estádios de desenvolvimento.

foi composta por 100 embriões viáveis. Para o grupo controle houve três repetições. Para os grupos tratados foram realizadas sete repetições.

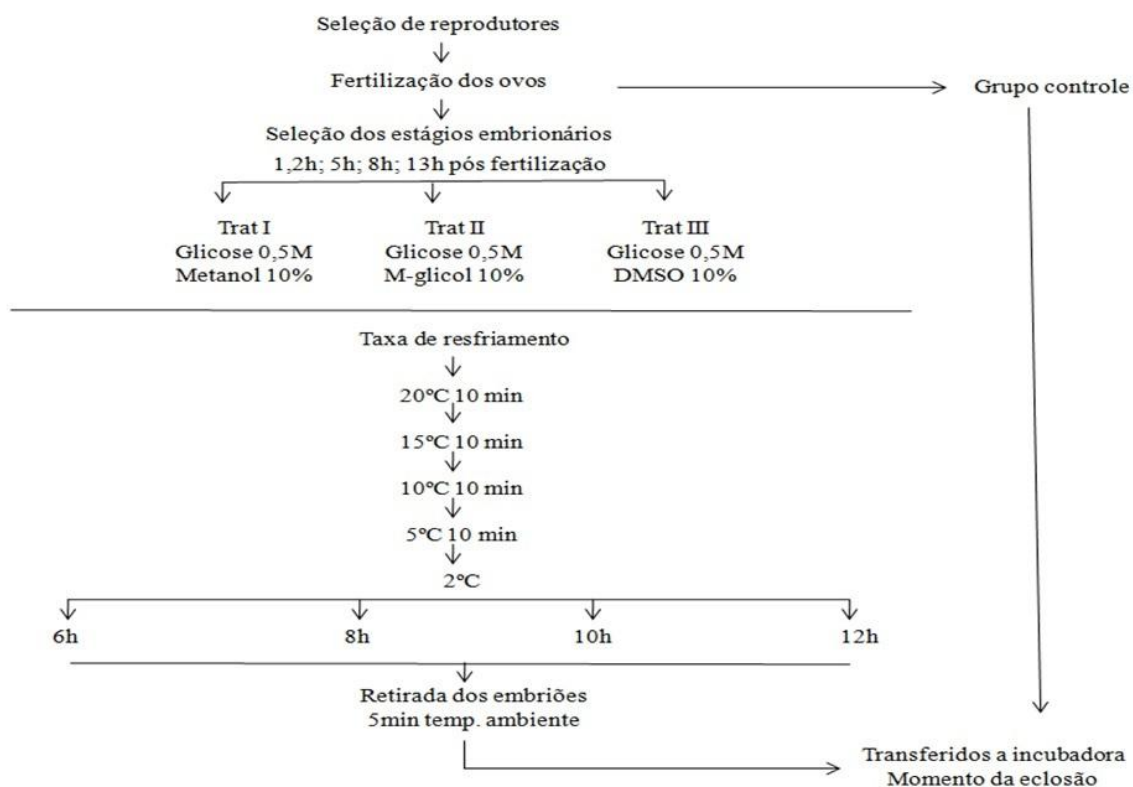


Figura 1. Fluxograma do resfriamento de embriões de *Colossoma macropomum* nos quatro estádios embrionários em quatro tempos de estocagem. Adaptado de Lopes et al. (2011).

Figure 1. Flowchart cooling embryos *Colossoma macropomum* the four embryonic storage time in four stages. Adapted from Lopes et al. (2011).

Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão (DP). Quando os dados não seguiam a distribuição normal, transformações arco seno eram realizadas. Os dados foram testados para diferenças significativas por ANOVA, seguido do

Teste de Tukey, quando necessário. O nível de significância para todos os testes estatísticos foi de 0,05. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R

Resultados e Discussão

O porcentual de larvas vivas, a partir dos ovos selecionados viáveis para

Em relação as larvas vivas com desenvolvimento embrionário completo, foi observada diferença estatística significativamente superior ($p \leq 0,05$) na média dos embriões resfriados em solução de glicose-metanol quando comparados com os tratamentos glicose-metilglicol ou glicose-DMSO (Figura 2).

No tratamento glicose-metanol, foi observada uma diminuição estatística significativa ($p \leq 0,05$) no número de larvas à medida que o tempo de estocagem

os tratamentos do grupo controle (Quadro 1).

aumentou, resultando maior média a dos embriões resfriados por 6 horas.

Não foi observada diferença estatística significativa ($p > 0,05$) na média de sobrevivência larval entre os tratamentos glicose-metilglicol e glicose-DMSO, quando resfriados por 6 e 12 horas, entretanto, no tratamento glicose-metilglicol, a sobrevivência é significativamente menor ($p \leq 0,05$) em relação aos outros tratamentos quando resfriado por 8 e 10 horas (Figura 2).

Quadro 1. Porcentual de larvas vivas (com desenvolvimento embrionário completo) para os embriões de *Colossoma macropomum*, nos estádios embrionários de 1,2; 5; 8 e 13-hpf utilizados como controle

Estádio embrionário	Larvas vivas (%)
Blastoderme - 1,2 hpf	88.1±1.0
Epibolia - 5-hpf	83.7±1.5
Fechamento do blastóporo - 8-hpf	93.3±1.1
Aparecimento da vesícula óptica - 13-hpf	97.4±1.1

Cada média \pm erro padrão da média representa os dados de três repetições com 100 embriões cada.

Each mean \pm standard error of the mean represents data from three repetitions with 100 embryos each.

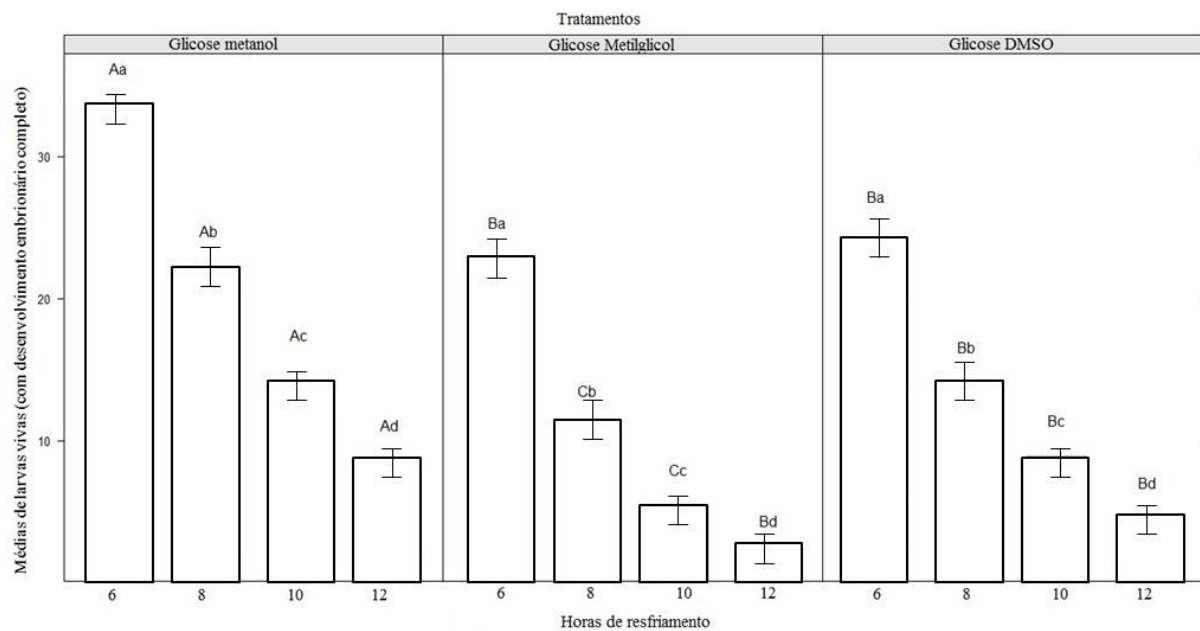


Figura 2. Média de larvas vivas (com desenvolvimento embrionário completo) de *Colossoma macropomum* tratados e resfriados por diferentes tempo de estocagem. Letras maiúsculas representam diferenças entre crioprotetores para os mesmos tempos de estocagem e letras minúsculas representam diferenças entre os tempos de estocagem para o mesmo tratamento. ANOVA e teste de Tukey.

Figure 2. Average live larvae (Full embryonic development) *Colossoma macropomum* treated and cooled by different storage time. Capital letters represent differences between cryoprotectants for the same storage time and lowercase letters represent differences between the storage time for the same treatment. ANOVA and Tukey test.

Os embriões tratados com solução de glicose-metanol apresentaram desenvolvimento larval estatisticamente superior (p≤0,05) completo

comparados aos outros tratamentos. Nos estádios de 1,2-hpf e 5-hpf não foi observada diferença estatística significativa ($p>0,05$) enquanto a fase de 13-hpf foi significativamente superior ($p\leq 0,05$) em relação as demais fases ontogenéticas, tanto do grupo tratado com glicose metanol quanto nos demais tratamentos (Figura 3). Não foi observada diferença estatística significativa ($p>0,05$) nas médias de larvas vivas entre os grupos tratados com glicose-metilglicol e glicose-DMSO, com exceção à fase de fechamento de blastóporo (8-hpf) do tratamento glicose-DMSO, que não apresentou diferença estatística significativa ($p>0,05$) com a mesma fase (8-hpf) do tratamento glicose-metanol (Figura 3).

Na fase de blastoderme (1,2-hpf) do tratamento glicose-metilglicol foi observada a menor média de larvas vivas dos grupos tratados. Foi observado que todos os embriões tratados apresentaram médias de larvas vivas decrescentes com o aumento de tempo de resfriamento.

Entretanto, os embriões tratados com glicose-metanol apresentaram médias estatísticas significativamente superiores ($p\leq 0,05$) comparadas aos demais tratamentos, tanto nas diferentes fases ontogenéticas (1,2; 5; 8; 13-hpf) como no tempo de estocagem a 2°C (6,8,10, 12 horas) (Figura 3). Nos primeiros estádios embrionários (1,2-hpf; 5-hpf) foram observadas em todas as repetições, larvas vivas com desenvolvimento completo em todos os tempos de resfriamento (6, 8, 10, 12 horas) para embriões tratados com glicose-metanol. Para os tratamentos glicose-metilglicol e glicose-DMSO, o número de larvas vivas foi zero a partir de 10 horas de resfriamento.

Na fase de fechamento de blastóporo (8-hpf), não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$) na média de larvas vivas nos tratamentos glicose-metanol e glicose-DMSO nos tempos de resfriamento 8 e 10 horas, entretanto, por 12 horas de estocagem a 2° C, observou-se um aumento estatístico significativo

($p \leq 0,05$) na média de larvas vivas de embriões tratados com glicose-metanol (Figura 4).

Nas fases ontogenéticas de fechamento do blastóporo e aparecimento de vesícula óptica (8-hpf; 13-hpf) ocorreu um aumento de larvas nos tempos de resfriamento maior (10, 12 h) nos tratamentos glicose-metanol e glicose-DMSO. Entretanto, no estágio de 13-hpf, há uma diferença estatística

A sensibilidade do embrião ao frio está relacionada com o tipo, número e mecanismo de reparação das células e tecidos, ou seja, quanto maior a complexidade das células, menor a possibilidade dessas células reagirem da mesma forma quando expostas ao frio (DINNYES et al 1998). Nesse estudo foi observado que, o maior número de larvas vivas com desenvolvimento completo apareceram nos tempos de estocagem mais curtos e a sobrevivência das larvas maior a medida que os estádios embrionários avançavam, sugerindo que a temperatura

significativamente maior ($p \leq 0,05$) de larvas vivas de embriões tratados com glicose-metanol quando comparada aos demais tratamentos (Figura 4). Os embriões tratados com solução de glicose-metilglicol apresentaram as médias de sobrevivência significativamente inferiores ($p \leq 0,05$) em relação aos tratamentos glicose-DMSO e glicose-metanol respectivamente.

de armazenamento tem uma influência acentuada no sucesso de eclosão de embriões resfriados de *Colossoma macropomum*.

Resultados semelhantes aos observados por AHAMMAD et al (2002) no resfriamento de embriões de *C. carpio*, cuja viabilidade dos embriões mantidos a 4°C foi superior a dos embriões mantidos a -2°C, quando mantidos resfriados por mais tempo. O fato dos embriões terem apresentado menor resistência quando expostos a períodos mais prolongados, pode estar relacionado à exposição a baixa

temperatura, o que evidencia a *macropomum* quando estocado por longo sensibilidade do embrião de *C.* período.

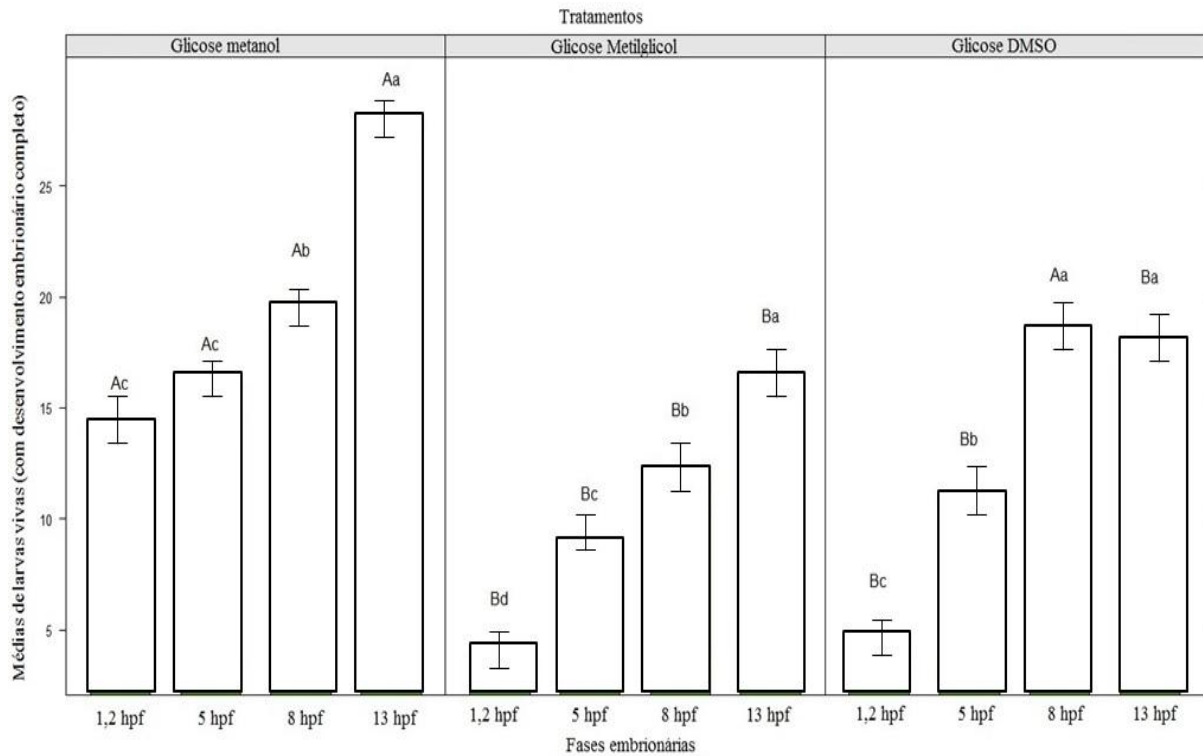


Figura 3. Média de larvas vivas (com desenvolvimento embrionário completo) para os embriões de *Colossoma macropomum*, tratados com glicose-metanol, glicose-metilglicol e glicose-DMSO, nas diferentes fases ontogênicas. Letras maiúsculas representam diferenças entre crioprotetores nas mesmas fases ontogênicas e letras minúsculas representam diferenças entre fases ontogênicas no mesmo tratamento. ANOVA e teste de Tukey.

Figure 3. Average live larvae (Full embryonic development) for embryos *Colossoma macropomum* treated with glucose-methanol, methyl glycol-glucose and glucose-DMSO in different ontogenetic stages. Capital letters represent differences between cryoprotectants in the same ontogenetic stages and lowercase letters represent differences between ontogenetic stages in the same treatment. ANOVA and Tukey test.

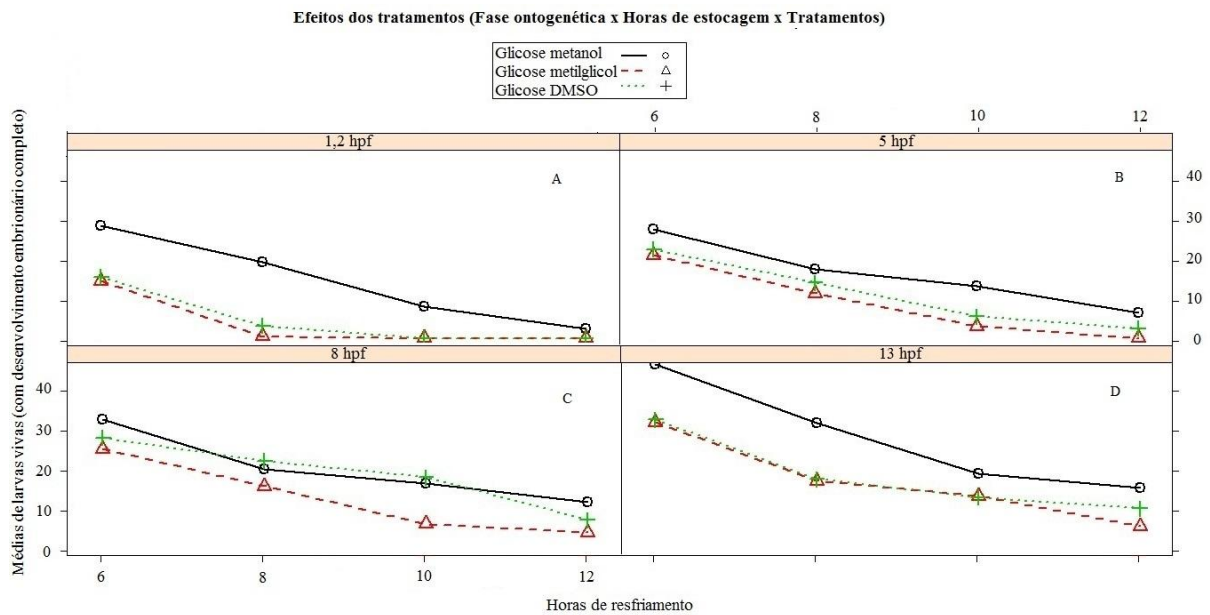


Figura 4. Médias de larvas de *P. brachypomus* de embriões em diferentes estádios ontogenéticos e resfriados em glicose combinada com metanol, metilglicol ou DMSO por 6 a 12 horas. A) Blastoderme (~1,2h pós fertilização). B) Epibolia (~5 h pós fertilização). C) Fechamento do blastóporo (~8h pós fertilização). D) Aparecimento da vesícula óptica (~13h pós fertilização).

Figure 4. Mean *P. larvae brachypomus* embryos at different stages in ontogenetic cooled and glucose in combination with methanol , methyl cellosolve or DMSO for 6 to 12 hours. A) blastoderm (~ 1.2 h post fertilization) . B) Epibolia (~ 5 hours post fertilization) . C) blastopore closure (~ 8h post fertilization) . D) Appearance of the optic vesicle (~ 13h post fertilization) .

Os estádios embrionários mais resistentes para o *C. macropomum*, foram os intermediários, com 8 e 13-hpf, que corroboraram com os resultados de

AHAMMAD et al. (2003), utilizando embriões de *Labeo rohita*, cuja maior sobrevivência dos embriões ocorreu também quando pode-se visualizar os

batimentos cardíacos. ZHANG et al. (2003) afirmaram que durante o processo ontogenético podem ocorrer “falhas” que inviabilizam o sucesso da criopreservação, como ocorreu no estágio de 1,2-hpf, em que foi verificado nenhum embrião viável. Do mesmo modo ZHANG & RAWSON (1995), trabalhando com embriões de *Danio rerio* em estádios iniciais, também verificaram este fato.

No presente estudo, isto pode ser atribuído ao fato de *C. macropomum* ser uma espécie tropical, fazendo com que a sensibilidade seja mais elevada nestes estádios de desenvolvimento embrionário, devido à elevada quantidade de lipídios no embrião, dificultando a ação de proteção dos crioprotetores.

Além disto, as fases iniciais de desenvolvimento embrionário são susceptíveis ao efeito tóxico sobre as células (BART 2000), ou seja, as vias metabólicas reguladoras nestes estádios ainda se encontram pouco desenvolvidas, sendo incapazes de compensar a toxicidade

dos crioprotetores (LAHNSTEINER 2009).

Dos crioprotetores usados, a associação de glicose com metanol apresentou maior taxa de larvas viáveis. A utilização do metanol como crioprotetor de embriões de peixe vem apresentando bons resultados (STREIT Jr et al., 2007; LOPES et al., 2011, 2012), sendo este potencializado quando associado a crioprotetor extracelular (DENNISTON et al. 2000).

Os crioprotetores extracelulares mais utilizados são sacarose, glicose e trealose (NIEMANN 1991, DENNISTON et al., 2000). Artigos de resfriamento de embriões de *Piaractus mesopotamicus* e *Prochilodus lineatus* vem tido bons resultados no uso de sacarose associada à metanol (LOPES et al. 2010; LOPES et al. 2012; NINHAUS-SILVEIRA et al. 2012, SILVA COSTA et al. 2012) e em resfriamento de embriões de *P. mesopotamicus*, a associação glicose-metanol apresentou taxas de eclosão

inferiores quando comparada à sacarose-metanol (STREIT Jr et al. 2007). A associação glicose-metanol tem tido sucesso na criopreservação de gametas de espécies como *P. lineatus* (VIVEIROS et al., 2010), glicose-metanol e glicose-metilglicol em *Piaractus brachipomum* (NASCIMENTO et al., 2010). FORNARI (2012) obteve bons resultados no resfriamento de embriões de *C. macropomum* em solução de sacarose-metanol a -8°C, entretanto, não há relatos de resfriamento de embriões de *C. macropomum* utilizando glicose como crioprotetor externo.

Apesar de não ter sido observado resultados satisfatórios com o dimetilsulfóxido no resfriamento de embrião de *C. macropomum*, nesse trabalho, em embriões de “red drum” (*Sciaenops ocellatus*), ROBERTSON et al. (1988) que testaram glicerol, DMSO, metilglicol, metanol, sacarose e sal marinho, 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 robalo (*Scophthalmus maximus*), o DMSO foi menos tóxico que o metanol e o metilglicol 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.

O crioprotetor metilglicol mostrou-se inapropriado para o resfriamento de embriões de *C. macropomum*, apresentando taxa de eclosão significativamente inferior aos crioprotetores metanol e dimetilsulfóxido, resultado semelhante obtido em resfriamento de embriões de *P.*

mesopotamicus por STREIT Jr et al. (2007).

A toxidez do crioprotetor metilglicol pode estar relacionado à interferência deste crioprotetor no metabolismo do embrião, o que poderia ter provocado uma desestruturação celular e, conseqüentemente, a morte do embrião. 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.

Conclusão

Conclui-se portanto que os estádios embrionários de fechamento de blastóporo (8-hpf) e aparecimento de vesícula óptica (13-hpf) podem ser considerados mais recomendados para a utilização em protocolo de resfriamento de embriões de *C. macropomum* mantidos até 8 horas a 2°C, sendo que o melhor resultado foi

observado no estágio de 8-hpf estocado por seis horas.

Entretanto, fatores relacionados a injúrias no resfriamento e, controle total da permeabilidade e osmorregulação do embrião devem ser considerados além de testes com outros tipos de crioprotetores extracelulares.

Refêrencias 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. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0011-2240\(02\)00012-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0011-2240(02)00012-3)
- 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, p. 1-16, 2003. Disponible em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0011-2240\(02\)00138-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0011-2240(02)00138-4)

ASAHINA E.; TAKAHASHI T. Cryopreservation of sea urchin embryos and sperm. **Development, Growth and Differentiation**, v. 21, p. 423-430. 1979. Disponible em: Doi: 10.1111/j.1440-169X.1979.00423.x

BART A. New approaches in cryopreservation of fish embryos, In: **CRYOPRESERVATION IN AQUATIC SPECIES**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, 2000. p.179-187.

BEIRÃO 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. Disponible em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.039>

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. Disponible em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2003.10.001>

CABRITA E.; ROBLES V.; CHEREGUINI O.; PAZ P.; ANEL L.; HERRAEZ M.P. Me₂SO influx in turbot embryos exposed to a vitrification protocol. **Theriogenology**, v.60, p. 463-473, 2003. Disponible em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00033-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00033-5)

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. Disponible em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.077>

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. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00107-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00107-5)

CHEN S.L.; TIAN Y.S. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. **Theriogenology**, v. 63, p. 1207-1219, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.06.007>

COSTA R.S.; VELARDI J.M.C.; SENHORINI J.A.; VERÍSSIMO-SILVEIRA R.; SILVEIRA A.N. Resfriamento de embriões de peixes neotropicais In: AQUACIÊNCIA, PALMASTO, 2012.

DENNISTON R.S.; MICHELET S.; GODKE R.A. Principles of cryopreservation. In: CRYOPRESERVATION IN AQUATIC SPECIES. World Aquaculture Society, Baton Rouge, 2000. p.59-74.

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. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.05.064>

DINNYÉS A.B.; URBÁNYI B.; BARANYAI I. Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants: work in progress. **Theriogenology**, v. 50, p.1-13, 1998. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00108-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00108-3)

DOBRINSKY J.R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos, **Theriogenology**, v. 57, p.285-302, 2002. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00672-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00672-0)

FORNARI D.C. **Crioconservação de embriões de tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. Maringá, 2012. 91p. Tese

de Doutorado em Zootecnia. Universidade Estadual de Maringá.

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. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.07.001>

HOLT W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00152-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00152-4)

Ibama 2008. Estatística da Pesca. 2006. Brasil: grandes regiões e unidades da Federação. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília. 174p.

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

[http://dx.doi.org/10.1016/S0011-2240\(02\)00106-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0011-2240(02)00106-2)

LAHNSTEINER F. The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, v.69, p.384-396, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.10.007>

LAHNSTEINER F. Factors affecting chilled storage of zebrafish (*Danio rerio*) embryos **Theriogenology**, v.72, p. 333-340, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.03.003>

LIU X.H.; ZHANG T.; RAWSON D.M. Feasibility of vitrification of zebrafish embryos using methanol. **Cryoletters**, v.19, p. 309-318, 1998.

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.

Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology>.

2010.09.030

LOPES T.S.; STREIT JR D.P.; FORNARI

D.C.; OLIVEIRA D.; RIBEIRO

R.P.; RIBEIRO R.P.; ROMAGOSA E.

Chilling curves for *Piaractus*

mesopotamicus (Holmberg, 1887) embryos

stored at -8°C. **Zygote**, p.1-6, 2012.

Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1017/S096719941200>

0020

NASCIMENTO A.F.; MARIA A.N.;

PESSOA N.O.; CARVALHO M.A.M.;

VIVEIROS A.T.M. Out-of-season sperm

cryopreserved in different media of the

Amazonian freshwater fish pirapitinga

(*Piaractus brachypomus*). **Animal**

Reproduction Science, v.118, p. 324-329,

2010. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci>.200

9.07.002

NIEMANN H. Cryopreservation of ova

and embryos from livestock: current status

and research needs.

Theriogenology, v. 35, p. 109-124, 1991.

Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/0093->

691X(91)90151-3

NINHAUS-SILVEIRA A.; COSTA R.S.;

VELARDE J.M.C.; SENHORINI J.A.;

VERÍSSIMO-SILVEIRA R. Toxicidade

de crioprotetores aos embriões de

Prochilodus lineatus. In: AQUACIÊNCIA,

Palmas-TO, 2012.

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. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1006/cryo.1997.2006>

ROBERTSON S.M.; LAWRENCE A.L.;

NEILL W.H.; ARNOLD C.R.;

MCCARTY G. Toxicity of the

cryoprotectants glycerol, dimethyl

sulfoxide, ethylene glycol, methanol,

sucrose, and sea salt solutions to the

embryos of red drum. **Progressive Fish-**

Culturist, v. 50, p.148-154, 1988.

Disponível em: DOI:10.1577/1548-8640(1988)050<0148:TOTCGD>2.3.CO;2
ROBLES V.; CABRITA E.; REAL M.;
ÁLVAREZ R.; HERRÁEZ M.P.
Vitrification of turbot embryos:
preliminary assay. **Cryobiology**, v. 47, p.
30-39, 2003. Disponível em:
[http://dx.doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00066-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00066-X)

SANTOS G.; FERREIRA E.; ZUANON J.
Peixes Comerciais de Manaus. ProVázea,
Ibama, Manaus/AM. 2006. 144p.

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**, v. 42, p.1199-1202, 2007.
Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2007000800018>

VIVEIROS A.T.M.; NASCIMENTO
A.F.; ORFÃO L.H.; ISAU Z.A. Motility
and fertility of the subtropical freshwater
fish streaked prochilod (*Prochilodus
lineatus*) sperm cryopreserved in powdered
coconut water. **Theriogenology**, v. 74, p.
551-556, 2010. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.03.018>

XIAO Z.Z.; ZHANG L.L.; XU X.Z.; LIU
Q.H.; LI J.; MA D.Y.; XU S.H.; XUE
Y.P.; XUE Q.Z. Effect of cryoprotectants
on hatching rate of red seabream (*Pagrus
major*) embryos. **Theriogenology**, v.70,
p.1086-1092, 2008. Disponível em: doi:
10.1016/j.theriogenology.2008.06.028.

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**,
v.63, p. 763-773, 2005. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.04.011>

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

Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1006/cryo.1995.1023>