

# Toxicidade de crioprotetores em embriões de pacu *Piaractus mesopotamicus*.

## Cryoprotectant toxicity to pacu embryos *Piaractus mesopotamicus*

Viviane de Formiga Xavier Lund<sup>1</sup>; Irineu Machado Benevides Filho<sup>2</sup> e Erica Pauls<sup>2</sup>.

### Resumo

Embriões de pacu *Piaractus mesopotamicus* foram submetidos a sete tratamentos, com o objetivo de se testar a toxicidade de 2 crioprotetores: glicerol e dimetilsulfóxido (DMSO), e suas associações à sacarose, a temperatura ambiente de 28°C. Nenhum embrião sobreviveu aos tratamentos contendo glicerol. O DMSO foi o crioprotetor que apresentou menor toxicidade aos embriões de pacu.

**Palavras chave:** peixe, congelamento, crioprotetores, embriões.

### Introdução

À medida que as fazendas de criação de peixes se expandem, cresce a necessidade de se desenvolver novas técnicas de reprodução, que permitam a preservação de pools genéticos, tornando possível a estocagem quase que indefinida de genes desejáveis. A criopreservação de embriões de peixes, pode aumentar substancialmente a eficiência da seleção de espécies íctias cultiváveis, assim como é feito com outras espécies domésticas. Em se tratando de espécies selvagens, esta técnica pode salvar características únicas dentre estoques, evitar a perda de variabilidade genética dentro de uma determinada população e até mesmo o desaparecimento de toda uma população ameaçada de extinção, através da criação de bancos genéticos para peixes (Stoss, 1983).

Porém a criopreservação de oócitos e embriões de peixes parece ser um pouco mais complicada do que o congelamento de sêmen. Vários fatores interferem na remoção de água da célula durante o congelamento, principalmente a presença de duas membranas distintas (córion e membrana perivitelínica), as diferenças de permeabilidade de ambas as membranas e o grande volume do embrião (Stoss, 1983).

O sucesso obtido em congelamento de embriões mamíferos e o desenvolvimento de técnicas que determinam um regime de congelamento ótimo para um determinado tipo de célula, abrem possibilidades para aplicação de tal técnica em embriões de peixes (Stoss e Donaldson., 1983). Assim, o efeito dos tratamentos pré e pós congelamento devem ser cuidadosamente investigados, pois a concentração do crioprotetor, a

maneira como é adicionada e o tempo a que o ovo fica exposto a ele, afetam o desenvolvimento embrionário subsequente (Whittingham e Rosenthal, 1978).

Os crioprotetores podem ser intracelulares ou extracelulares. Aqueles que não penetram na célula são mais eficientes em velocidades de congelamento mais rápidas (Meryman et al., 1977), contribuem para a desidratação osmótica mas não protegem contra ela. Os mais usados são os açúcares, polímeros e lipoproteínas (Pursel e Johnson., 1989). Os crioprotetores intracelulares têm baixo peso molecular, alta solubilidade em água, e congelam em temperaturas bem baixas. Os mais comumente usados são o glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), etileno glicol e acetamida. (Pursel et al., 1989).

Vários são os estudos que procuram esclarecer questões sobre concentração do crioprotetor, o tempo de equilíbrio e a toxicidade. Em geral os crioprotetores mais usados em organismos aquáticos são: DMSO, glicerol, etileno glicol, propileno glicol, acetamida, sacarose, trehalose e glicose (Harvey et al., 1983; Whittingham e Rosenthal, 1978; Zhang et al., 1989; Kasai et al., 1992; Chao et al., 1994), sendo o DMSO considerado o menos tóxico (Whittingham e Rosenthal, 1978; Zhang et al., 1989; Chao et al., 1994).

Segundo Kasai et al. (1992), o efeito tóxico dos crioprotetores pode ser reduzido pela associação da sacarose ao meio de congelamento. Nestas condições admite-se uma concentração de sacarose de 0,25 a 0,5M, enquanto que para a retirada do crioprotetor, Pursel e Johnson. (1989) e Széll e Shelton. (1986), sugerem que a concentração final de sacarose seja 1,0M.

O objetivo do presente trabalho foi o de determinar a toxicidade de dois crioprotetores, DMSO e glicerol, amplamente utilizados em criopreservação de embriões de mamíferos e suas associações à sacarose.

### Material e Métodos

Foram utilizados em duas fases de desenvolvimento (aparecimento de cauda e pré-eclosão) embriões de pacu *Piaractus mesopotamicus* que foram submetidos a sete tratamentos, em temperatura ambiente de 27°C. Os embriões foram obtidos através de desova artificial, com indução hormonal, utilizando-se uma dose pre-

<sup>1</sup> - Médica Veterinária, IBAMA - SUPES/RJ, Praça XV de Novembro 42/4º andar, 20010-000, Rio de Janeiro

<sup>2</sup> - Professor Titular - Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brazil Filho, 64, 24230-340, Niterói, RJ, Brasil

paratória (0,5mg/kg) de hormônio luteinizante (LHRH). Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Reprodução de Peixes da SENDAS Agropecuária, localizada no município de Magé, RJ, durante os meses de abril e maio 1995.

**Tratamento 1** - 65 embriões em fase de pré-eclosão foram submetidos ao glicerol 15% e equilibrados em duas etapas, 5% e 10%, ficando 15 minutos em cada concentração. A retirada do crioprotetor foi feita em concentrações decrescentes do mesmo, 10% e 5%, ficando os embriões 5 minutos em cada uma, sendo lavados em água corrente e observados por 1h e 15 minutos.

**Tratamento 2** - 65 embriões em fase de pré-eclosão, foram submetidos ao DMSO 15%, e equilibrados em três etapas, 4%, 8% e 11%, ficando os embriões 15 minutos em cada concentração. A retirada do crioprotetor foi feita em concentrações decrescentes do mesmo, 11%, 8% e 4%, ficando os embriões 5 minutos em cada uma, sendo lavados em água corrente e observados por 1h15 minutos.

**Tratamento 3** - 50 embriões, em fase de aparecimento de cauda, foram submetidos ao glicerol 10% + 0,125M de sacarose e equilibrados em duas etapas, 5% e 10%, ficando 15 minutos em cada concentração.

**Tratamento 4** - 50 embriões, em fase de aparecimento de cauda foram submetidos ao DMSO 20% + 0,125M de sacarose e equilibrados em cinco etapas, 4%, 8%, 11% + 0,125M de sacarose, 15% + 0,125M de sacarose, ficando 15 minutos em cada concentração. A retirada do crioprotetor foi feita nas concentrações 15% + 0,125M sacarose e 8%, sendo embriões lavados em água corrente e observados por 2h30 minutos.

**Tratamento 5** - 50 embriões, em fase de aparecimento de cauda, foram submetidos ao DMSO 20% + 0,125M sacarose, sendo equilibrados nas concentrações de 15% e 15% + 0,125M sacarose, ficando 15 minutos em cada concentração. A retirada do crioprotetor foi feita nas concentrações 20%, 15%, 11% e 8%, ficando os embriões 5 minutos em cada concentração, lavados em água corrente e observados por 2h30 min.

**Tratamento 6** - 50 embriões, em fase de aparecimento de cauda, foram submetidos ao DMSO 20% + 0,125 M sacarose, ficando 15 minutos nesta concentração. A retirada do crioprotetor foi feita nas soluções 20%, 15%, 11%, 8% e 4% de DMSO ficando os embriões 5 minutos em cada uma, sendo lavados em água corrente e observados por 2 h 30 minutos.

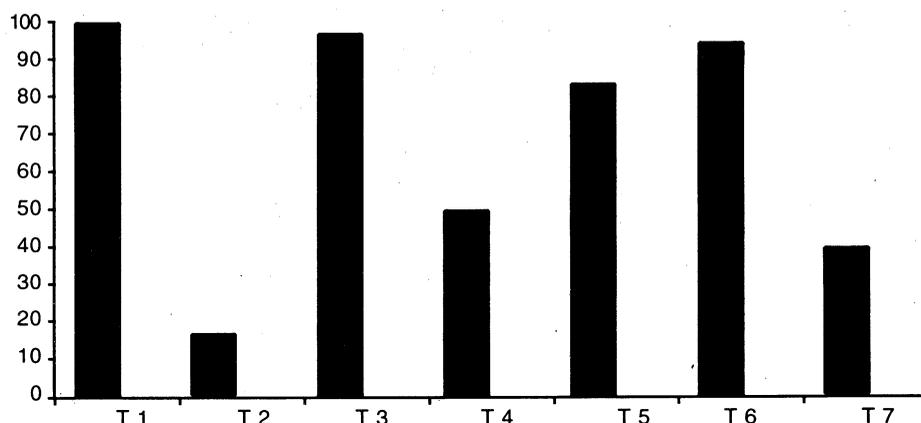
**Tratamento 7** - 50 embriões, em fase de aparecimento de cauda, foram submetidos ao DMSO 20% + 0,125 M sacarose, ficando 15 minutos nesta concentração. A retirada do crioprotetor foi feita em solução de sacarose a 1,5M por 10 min., sendo os embriões lavados em água corrente e observados por 2h 30 minutos.

## Resultados e Discussões

Pela observação dos resultados contidos na Tabela 1 e na FIGURA 1, podemos notar que houve grande mortalidade dos embriões, exceto nos tratamentos 7 e, principalmente no 2 onde apenas 15,4% dos embriões morreram. Nenhum dos embriões sobreviveu aos tratamentos contendo glicerol, sugerindo que este é altamente tóxico aos embriões de pacu.

**Tabela 1** - Mortalidade de embriões de pacu submetidos a sete tratamentos com glicerol e DMSO dimetilsufóxido em diferentes concentrações, usados como crioprotetores associados ou não à sacarose

Tratamento	Número de embriões	Fase do desenvolvimento	Número de sobreviventes	Mortalidade (%)
1	65	pré-eclosão	0	100
2	65	pré-eclosão	55	15,4
3	50	ap. cauda	0	100
4	50	ap. cauda	23	54
5	50	ap. cauda	9	82
6	50	ap. cauda	3	94
7	50	ap. cauda	33	34



**Figura 1** - Mortalidade de embriões de pacú submetidos a sete tratamentos com glicerol e DMSO em diferentes concentrações, usados como crioprotetores, associados ou não à sacarose.

Nossos resultados concordam com aqueles de Zhang et al. (1989) e Chao et al. (1994) que encontraram ser os estádios de desenvolvimento mais avançados os mais resistentes ao tratamento de criopreservação, e com o de Zhang et al. (1989) em que o DMSO é o crioprotetor de menor efeito tóxico. Quando testamos o efeito tóxico do glicerol sobre embriões de pacu, este foi tóxico nos dois estádios de desenvolvimento e nas duas concentrações testadas (15% e 10%), estando de acordo com os achados de Zhang et al. (1989) para embriões de carpa comum *Cyprinus carpio*. Mesmo quando adicionamos a sacarose, esta não diminuiu a toxicidade do glicerol 10%, conforme citam Kasai et al. (1992). Porém Whittingham e Rosenthal (1978) observaram que o glicerol 1,5M não afetou o desenvolvimento embrionário de *Clupea harengus*.

Apesar de Stoss e Donaldson (1983) concluírem que o período de equilíbrio é importante para reduzir o efeito tóxico do DMSO em embriões de truta e salmão, em nosso experimento, se compararmos os tratamentos 4, 5, 6 e 7, observamos que a colocação dos embriões de pacu na concentração final de DMSO não prejudicou o desenvolvimento embrionário, mesmo a 20% por 15 minutos. Em nosso estudo os embriões submetidos ao DMSO 15% (tratamento 2) apresentaram alta taxa de sobrevivência. Isto sugere que o mesmo tratamento no estágio de aparecimento de cauda levaria a uma melhor sobrevivência. Como a quantidade de trabalhos experimentais sobre o assunto é limitada, o campo está aberto para outras pesquisas (Stoss, 1983).

### Conclusões

As que podemos tirar, nas condições em que foram realizados os experimentos, são:

- O glicerol é tóxico para embriões de pacu em fase de pré-eclosão e aparecimento de cauda enquanto o DMSO se mostrou o crioprotetor de eleição;

- os resultados do experimento 7 indicam que a colocação dos embriões diretamente na concentração final do DMSO não prejudicou o desenvolvimento embrionário;
- entre os tratamentos utilizados o tratamento 2 foi o mais eficiente.

### Abstract

#### Cryoprotectant toxicity to pacu embryos *Piaractus mesopotamicus*

Fish embryos *Piaractus mesopotamicus* were submitted to seven treatments to test the toxicity of two cryoprotectants: glicerol and dimethylfoxidy (DMSO), and its associations with sucrose, at 28°C. There were no survival in treatments containing glicerol. DMSO was the cryoprotectant that show little toxicity to the embryos.

**Key words:** fish, cryopreservation, cryoprotectant, embryos

### Referências Bibliográficas

- CHAO, N., CHIANG, C., HSU, H., TSAI, C., LIN, T. Toxicity Tolerance Of Oyster Embryos To Select Cryoprotectants. *Aquatic Living Resources*, v. 7, p. 99-104, 1994.
- HARVEY, B., STOSS, J., BUTCHART, W. Supercooled Storage Of Salmonid Ova. *Canadian Technical Report Of Fisheries And Aquatic Sciences*, n. 1222, 9p., 1983.
- KASAI, M., HAMAGUCHI, Y, ZHU, S.E., MYIAKE, T., SAKURAI, T., MACHIDA, T. High Survival Of Rabbit Morulae After Vitrification In An Ethylene Glycol-based Solution By A Simple Method.. *Biology of Reproduction*, v. 46 p. 1042-1046, 1992.

- MERYMAN, H. T. WILLIAMS, R. J., DOUGLAS, M. S.T. J. Freezing Injury From Solution Effects And Its Prevention By Natural Or Artificial Cryoprotection. *Cryobiology*, v. 14, p. 287-302, 1977.
- STOSS, J. Fish Gamete Preservation An Spermatozoa Physiology. *Fish Physiology*, v. 9b, p. 305-350, 1983.
- STOSS, J., DONALDSON, E. Studies On Cryopreservation Of Eggs From Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) And Coho Salmo (*Onchorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, v. 31, p. 51-65, 1983.
- SZELL, A. SHELTON, J. N. Sucrose Dilution Of Glicerol From Mouses Embryos Frozen Rapidaly In Liquid Nitrogen Vapour. *J. Reprod. Fert.*, v. 76, p. 401-408, 1986.
- PURSEL, V. J. JOHNSON, L.A. Cryopreservation Of Animal Germplasm Resources. Biotic Diversity And germplasm Preservation, Global Imperatives IN: KNUTSON, L., STONER, A.K. *Beltsville Symposia in Agricultura Research*, v. 13, p. 337-353, 1989.
- WHITTINGHAN, D.G. ROSENTHAL, H. Attempts To Preserve Herring Embryos At Subzero Temperatures. *Arch. Fisch. Wiss.*, v. 29 n. 1/2, p. 75-79, 1978.
- ZHANG, X.S. ZHAO, L. HUA, T. C., ZHU, H. Y. A Study On the Cryopreservation Of Camon Carp *Cyprinus carpio* Embryos *Cryo Letters*, v. 10 p. 271-278, 1989.

## VITÓRIA GASES MEDICINAIS E INDUSTRIAIS DISTRIBUIDOR (AIR LIQUID) ODB

OXIGÊNIO • ACETILENO • NITROGÊNIO • APARELHOS HOSPITALARES • CONsertos  
EM MANÔMETROS E APARELHOS DE MAÇARICO EM GERAL • CONsertos EM  
APARELHOS HOSPITALARES

**Fax: (021) 717-9827      Celular: (021) 971-8998**

Rua Silva Jardim, 210 - Ponta D'areia - Niterói - RJ  
Tel.: (021) 717-9827 - Noite, Domingos e Feriados: Tel.: (021) 717-3239