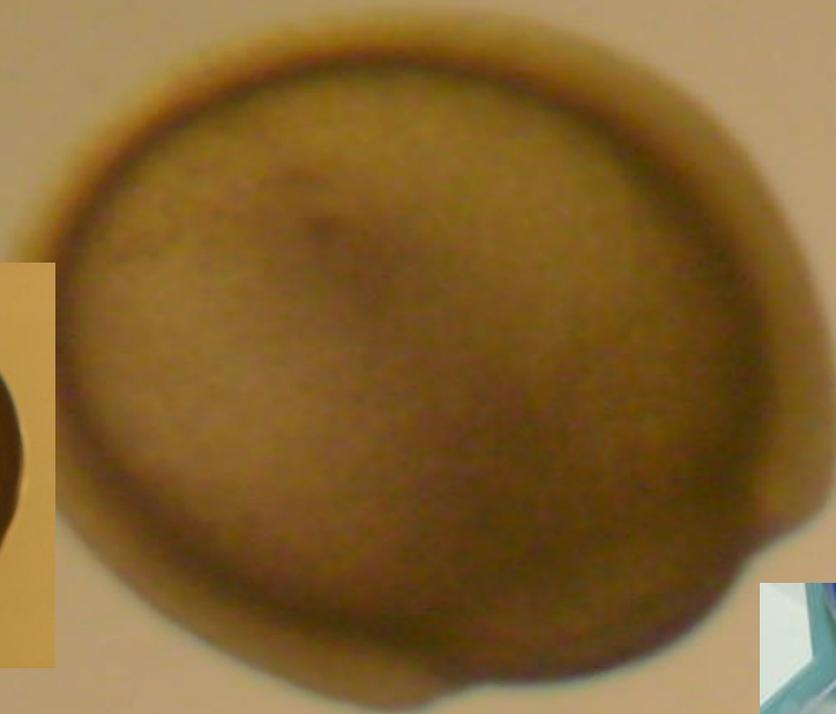
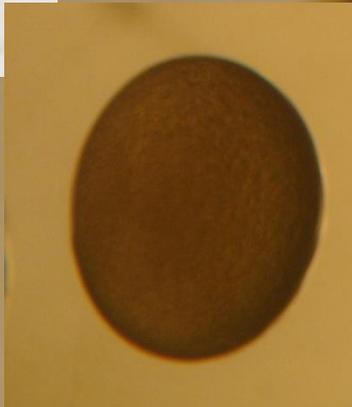
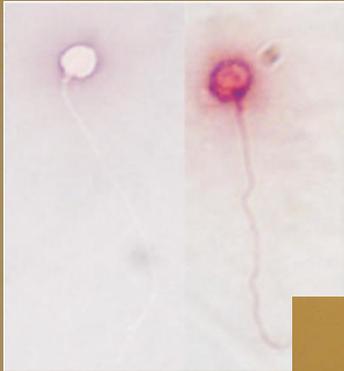


# Criopreservação de gametas



Dr. Darci Carlos Fornari – Genetic Fish Rise



# Inrodução:

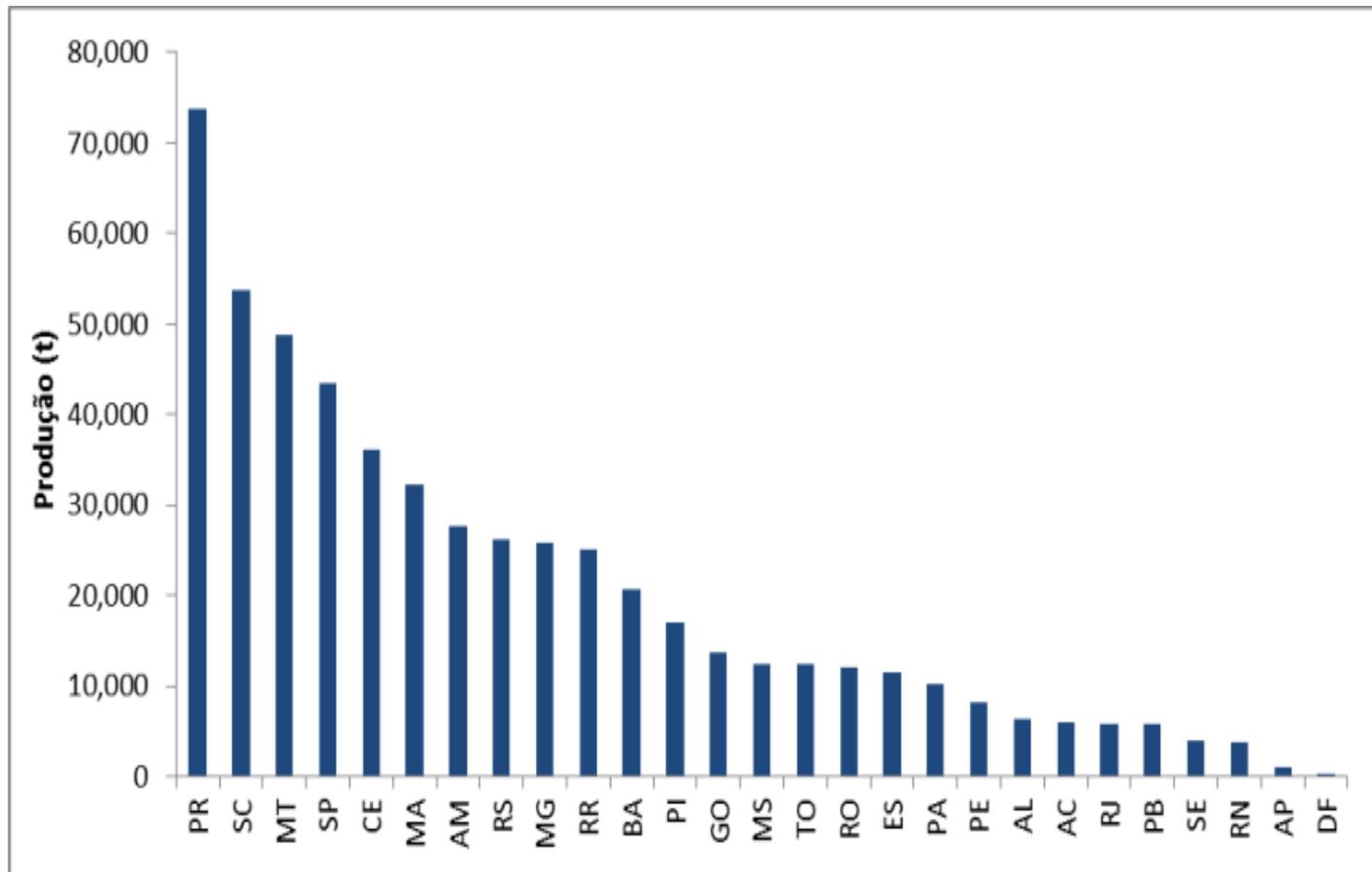
## Produção de proteína no mundo:

<b>Produto</b>	<b>Produção (Mil ton)</b>	<b>Exportação** (mil ton)</b>	<b>Consumo (mil ton)</b>
Pescados	145.100	32.348	116.960
Suínos	100.399	12.066	100.268
Aves	72.293	10.733	71.860
Bovinos	57.027	9.607	56.116
Caprinos e ovinos	13.236	1.007	13.139

Fonte: BNDS setorial, FAO, MPA e USDA

\*\* Dados da FAO refere-se aos países membros da ONU.

## Produção de pescado (t) da aquicultura continental por Unidade da Federação





# Genetic Fish Rise

**Figura 6: Forte crescimento provável na produção de aquicultura brasileira**



Fonte: Estimativas da FAO e do Rabobank, 2012.

Tradução: BeefPoint ([www.beefpoint.com.br](http://www.beefpoint.com.br)).



**Genetic Fish Rise**

## Tabela 2. Aumento do consumo per capita de Carnes, 2005 a 2030.

	2005	2030	Aumento %
Mundo	57,1	68,8	20,5
Bovina	9,4	10,6	12,7
Aves	12,6	17,7	40,4
Peixes	16,4	19,5	18,9
Suína	15,9	19,1	20,1
Outras	2,8	2,5	-10,7

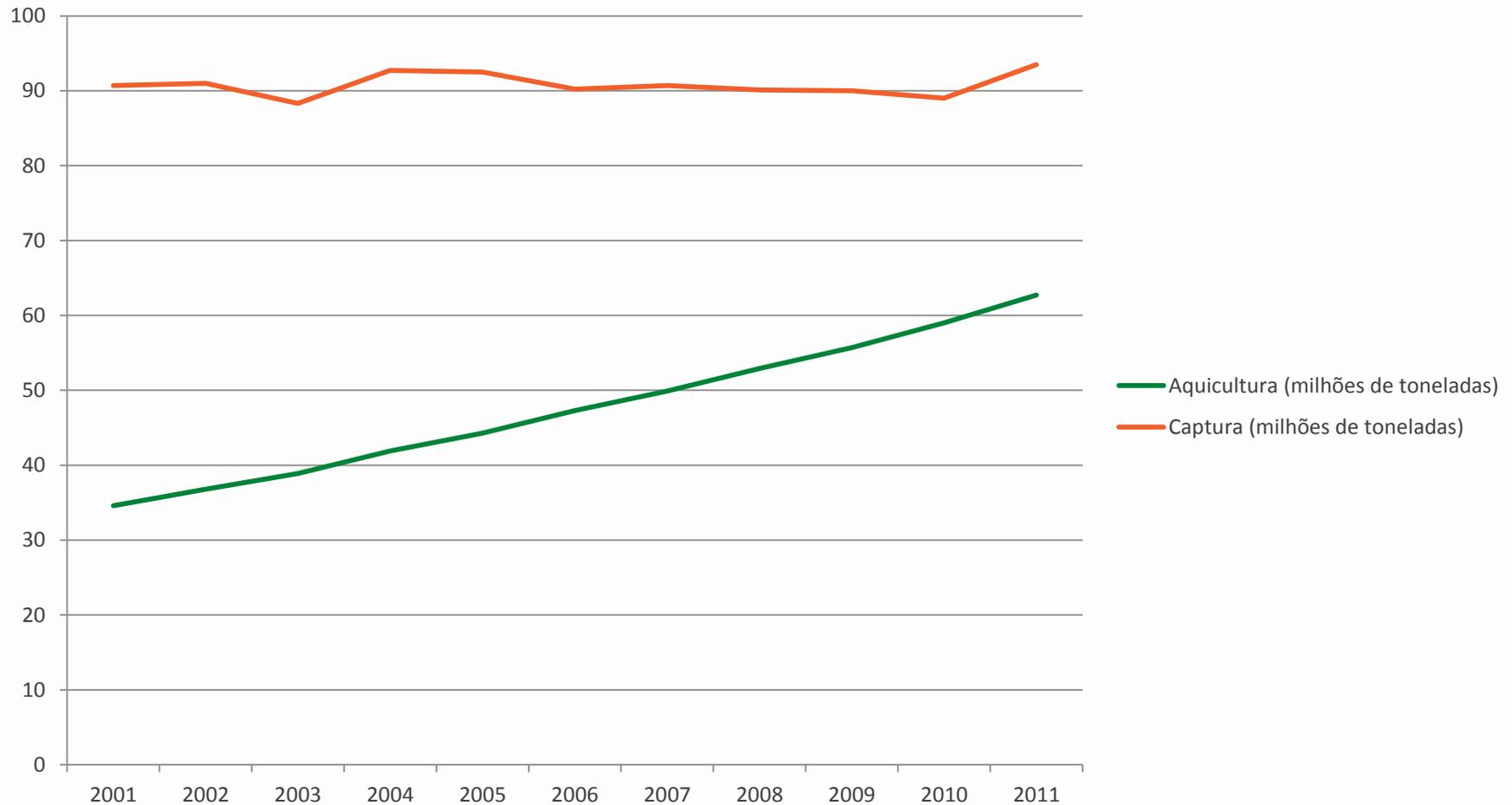
Fonte: FAO, 2006

- Consumo de pescado/hab/ano no Brasil?
- Quantos somos?



**Genetic Fish Rise**

# Produção da Aquicultura X Captura

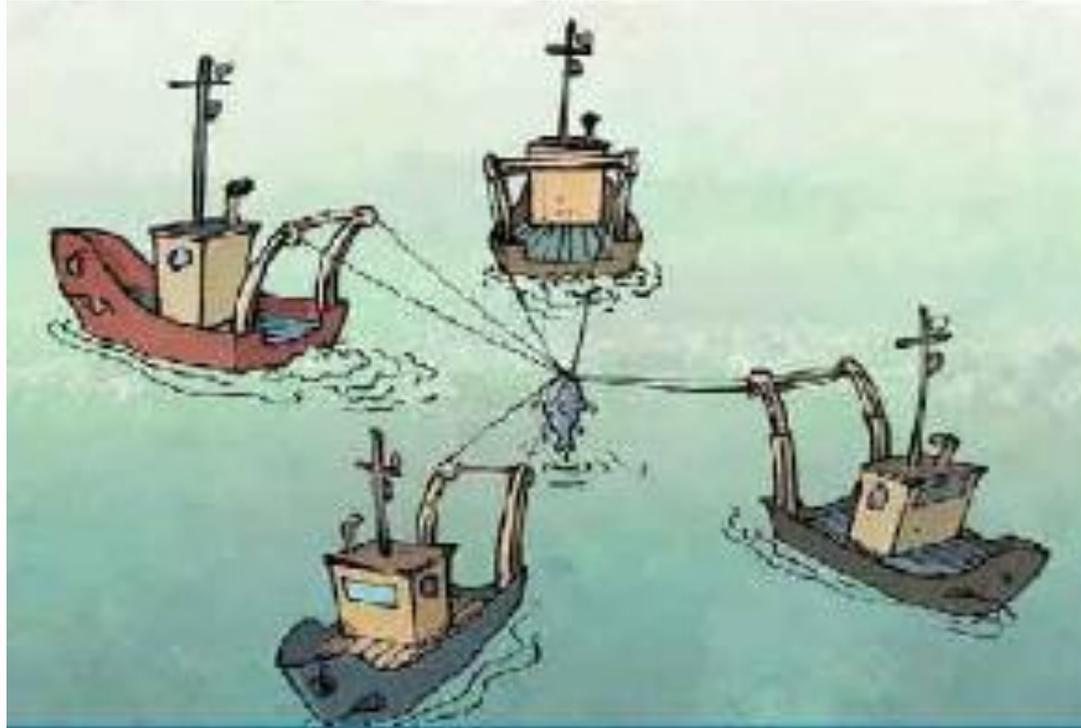


Fonte: FAO 2011



**Genetic Fish Rise**

# Pesca em Declínio





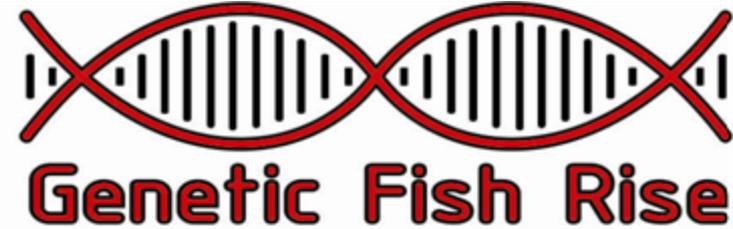
**Genetic Fish Rise**

# População Brasileira atual



- ***202 milhões***

- Consumo 11 kg/habitante/ano
- Consumo Total = 2.222.000 ton.
- A OMS (Organização Mundial da Saúde recomenda 12 kg/hab/ano
- Portanto OMS = 2.688.000 ton.
- Brasil produz = 1.300.000 ton. **faltam 1.388.000 ton.**



- Perspectivas para a piscicultura de peixes nativos no Brasil.
  - Potencial hídrico
  - Grãos
  - Clima
  - Topografia
- Cadeia produtiva.
  - Mercado
  - Processamento e industrialização



**Genetic Fish Rise**

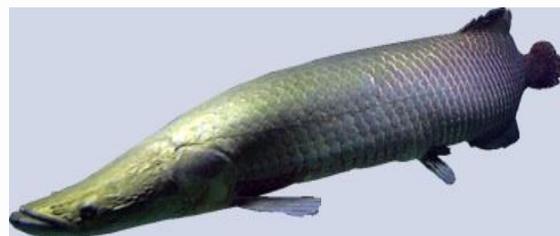
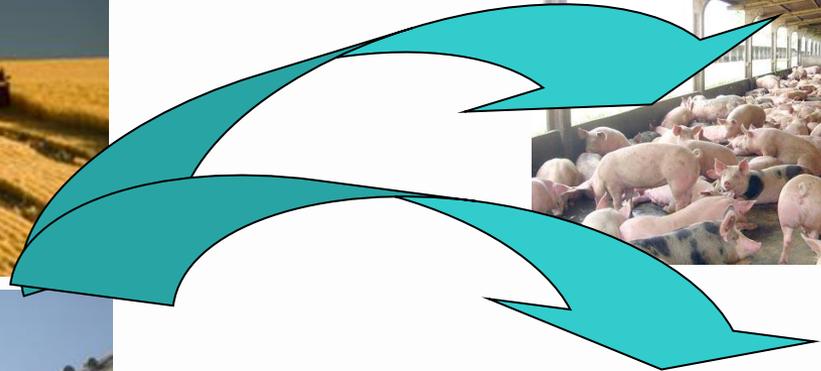
# Potencial Hídrico

13% da água doce do planeta



A maior parte dos rios brasileiros é de planalto, apresentando-se encachoeirados e permitindo, assim, o aproveitamento hidrelétrico.

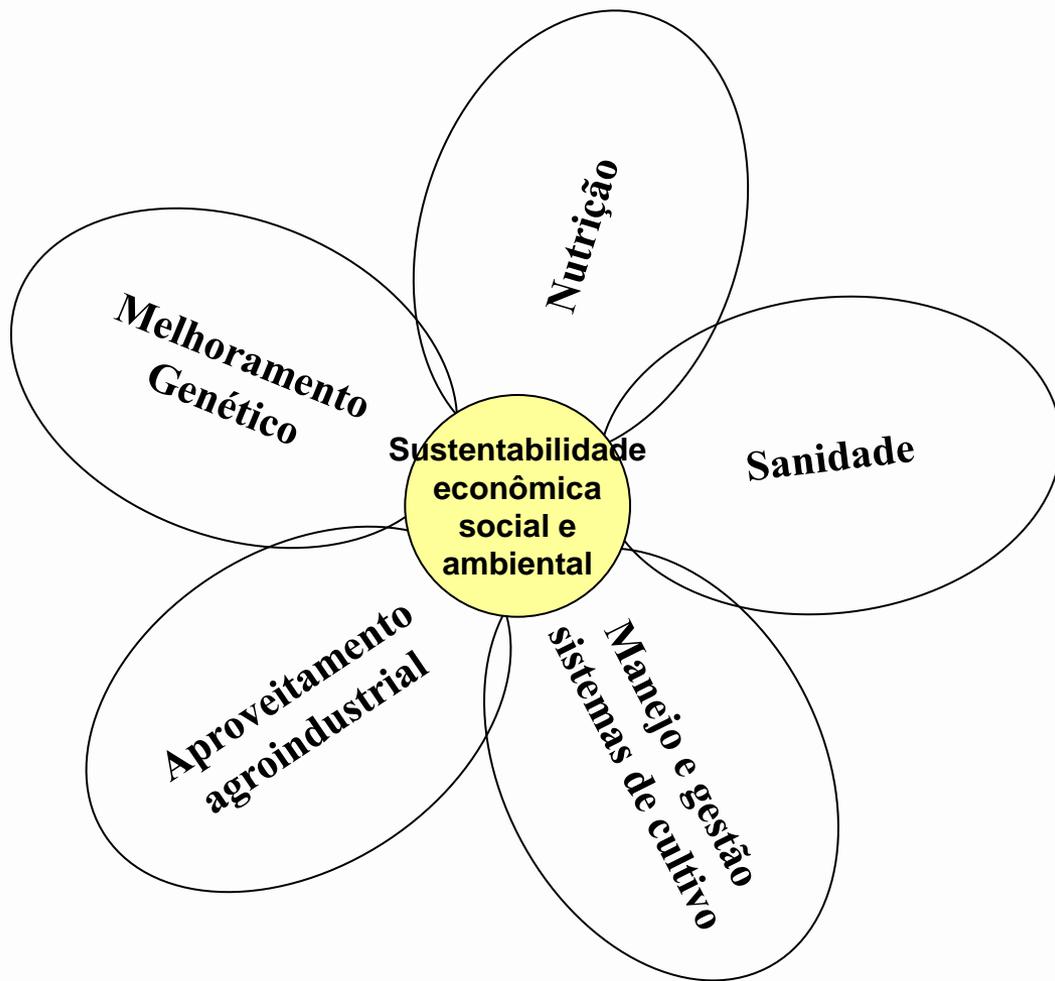
# Potencial agrícola



# Programa AquaBrasil



**Genetic Fish Rise**





# MELHORAMENTO GENÉTICO DO TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

Ministério da  
Pesca e Aquicultura





# População Base



- ✓ Núcleo
- ✓ Formação (populações nativas / estoques)
- ✓ Número de Famílias
- ✓ Identificação da progênie
- ✓ Seleção



# IDENTIFICAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES

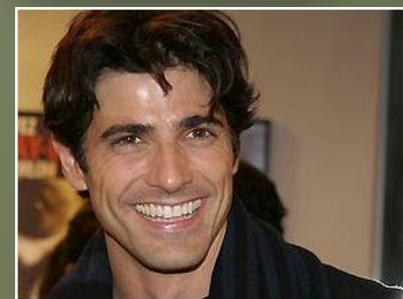
√ População base

- Variabilidade genética
- Divergência genética

População nativa x estoque



# O que é variabilidade genética?



x



x



????

????

????

????



# Estoque x nativa



**Seleção não intencional**

**Endogamia**

*Ne*

**Variabilidade genética**



**MONITORAMENTO  
GENÉTICO?**

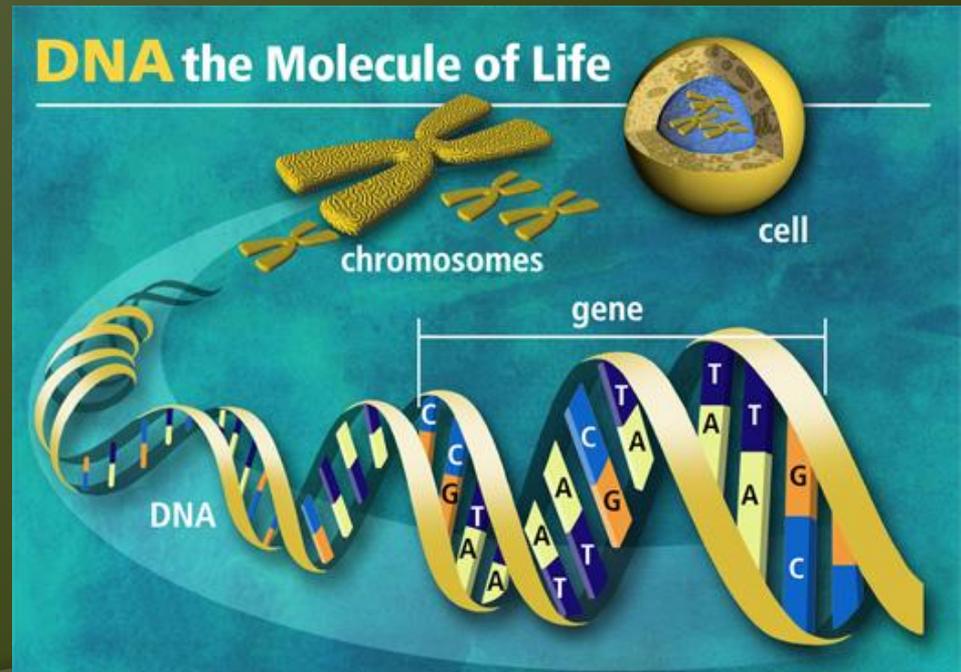
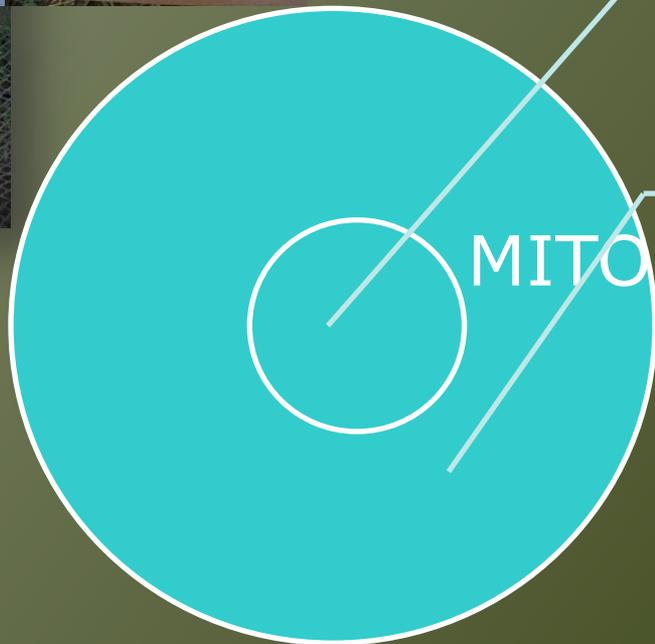


**MARCADORES  
MOLECULARES!!!**



DNA NUCLEAR

DNA MITOCHONDRIAL



✓ PCR

✓ RAPD

✓ Microssatélite

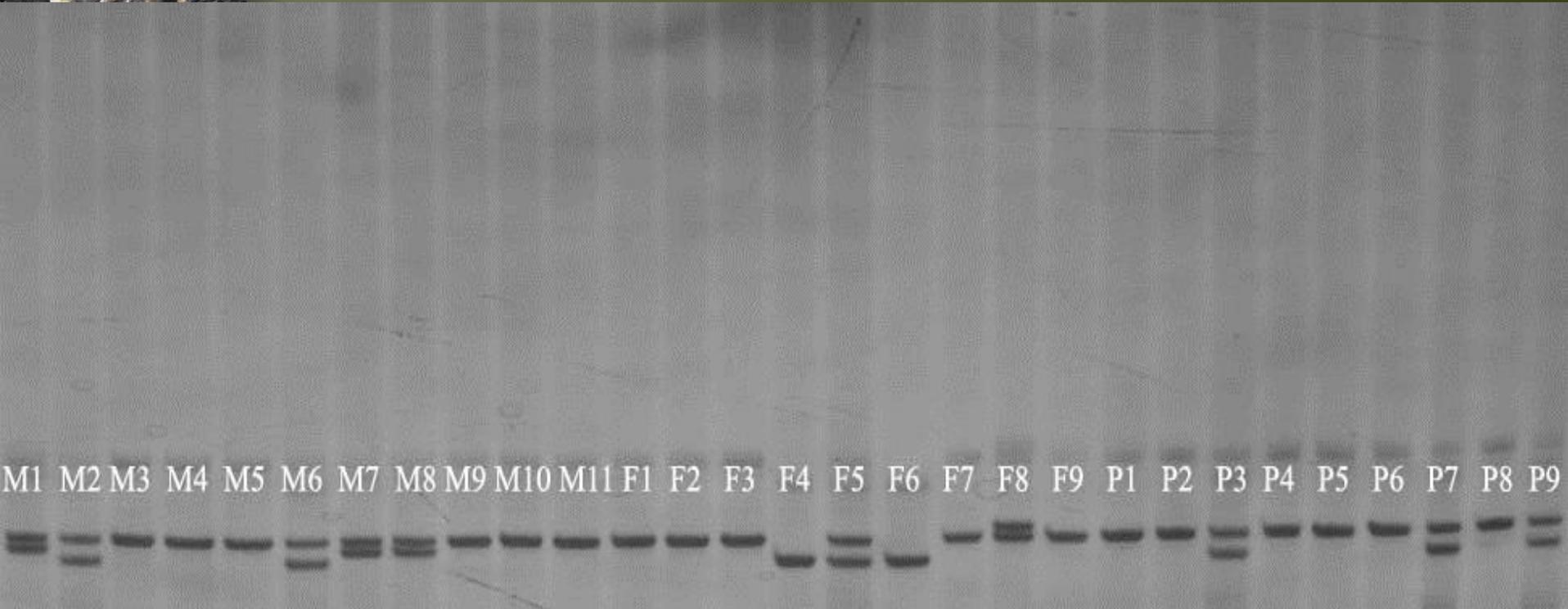
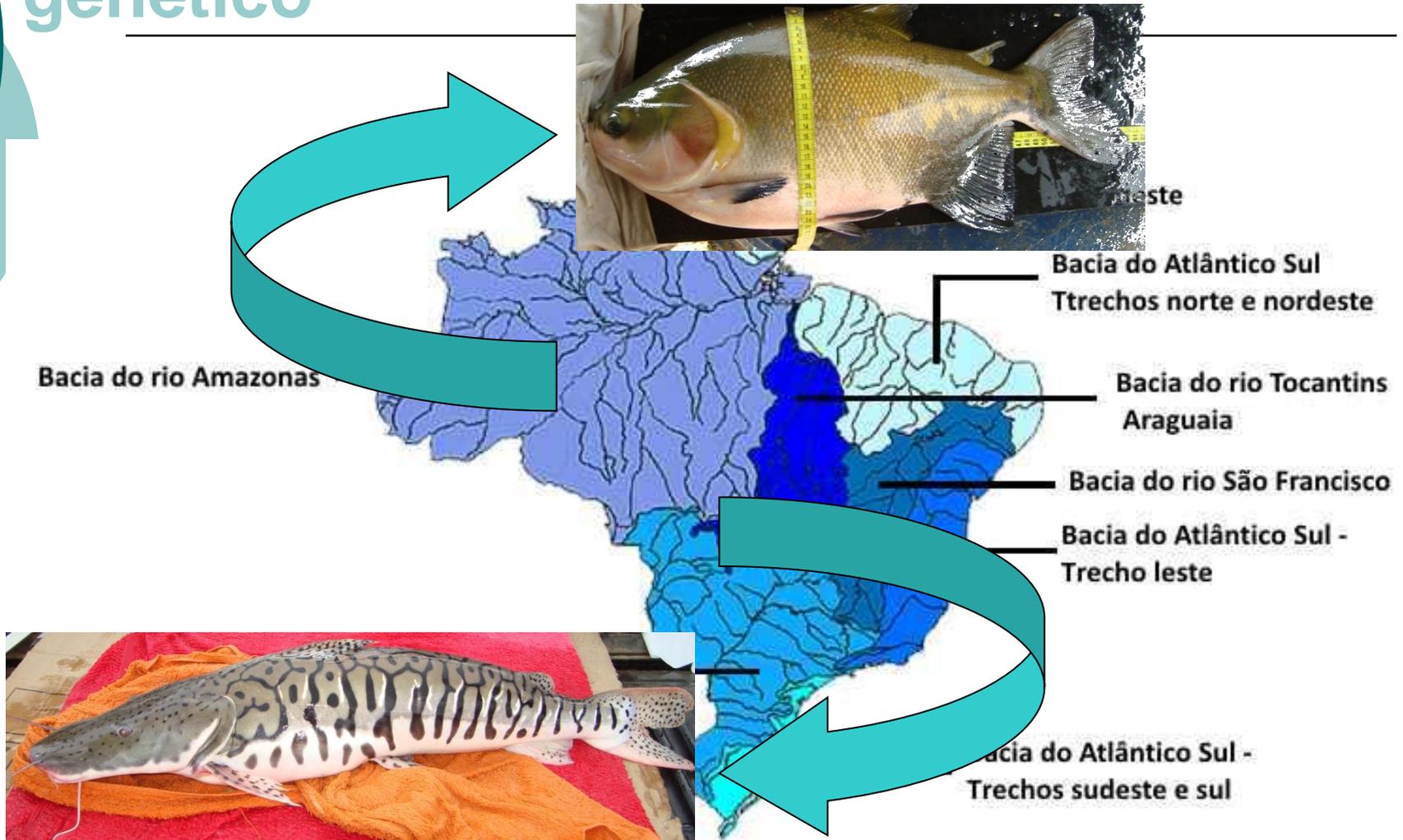


Figure 1 – Polyacrylamide gel showing four alleles in the locus Pme14 from males (M1 to M11), females (F1 to F9) and offspring (P1 to P9).

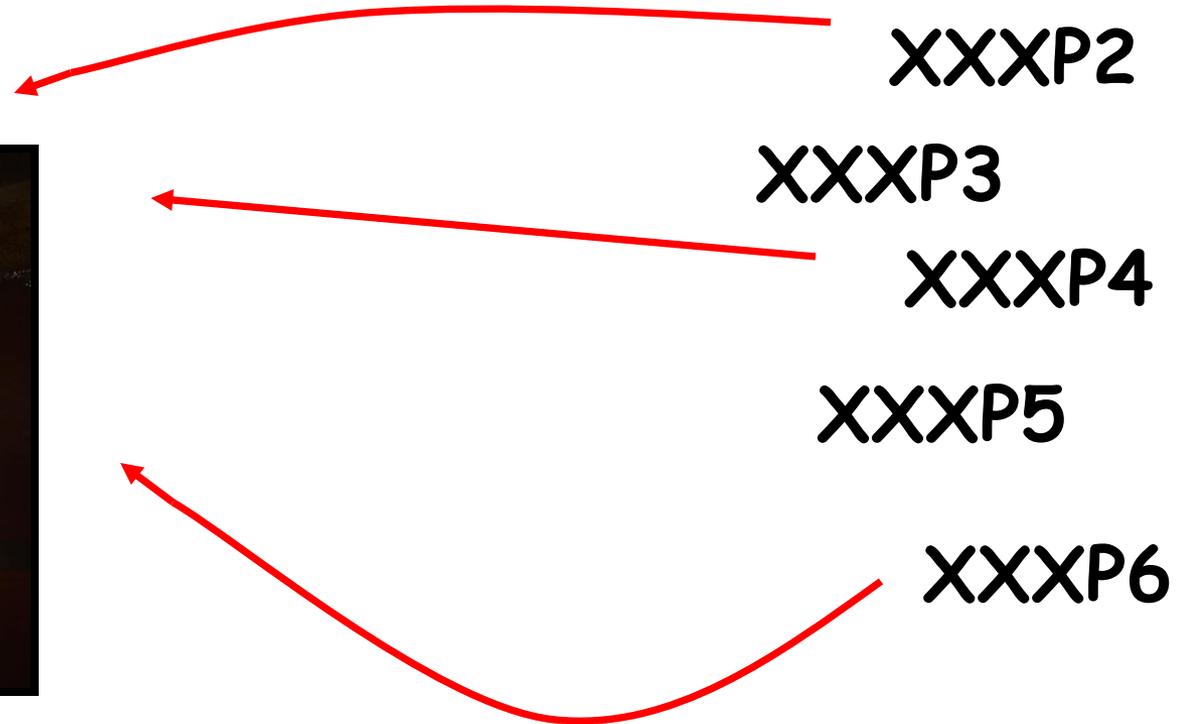


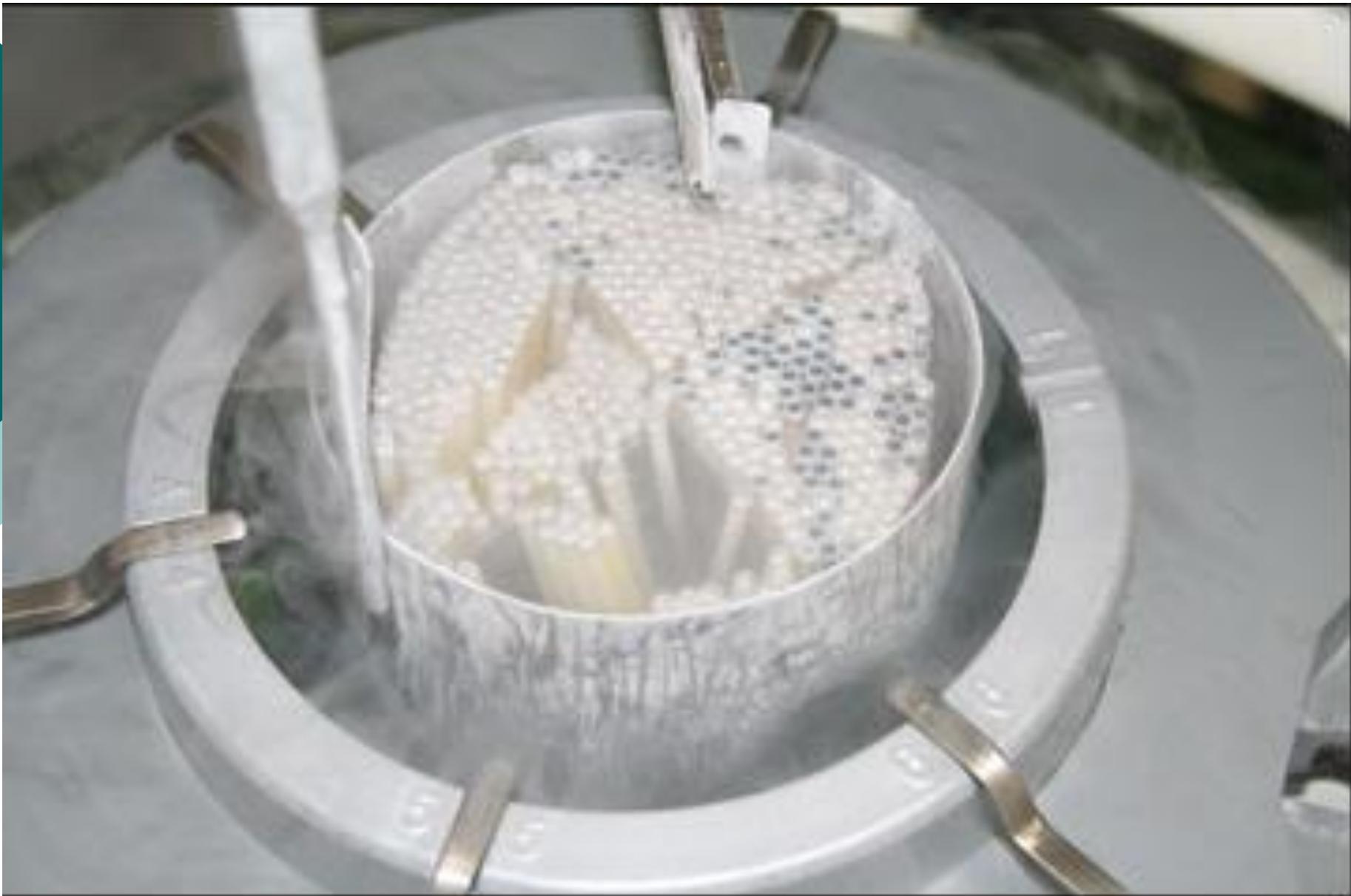


# Aplicação prática do sêmen congelado no programa de melhoramento genético



# Banco de germoplasma eficiente



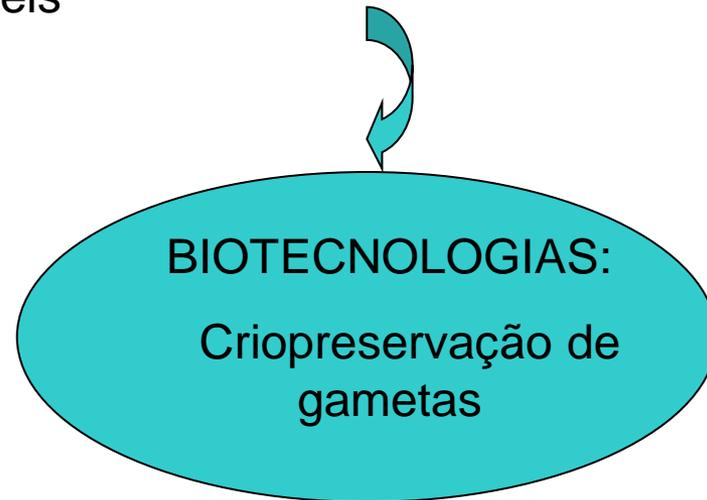


[darcifornari@geneticfish.com.br](mailto:darcifornari@geneticfish.com.br) – [www.geneticfish.com.br](http://www.geneticfish.com.br)

# INTRODUÇÃO

---

O custo ambiental e de oportunidade de mercado (piscicultura) perdidos com o desaparecimento de espécies de peixes são imensuráveis



Harvey (2000) → Banco Germoplasma

# Criopreservação

---

- Início dos estudos;
  - Primeiros trabalhos na década de 50;
  - Início com espécies nativas na década de 80;
  - Década de 90 houve um 'stand by';
  - Grande avanço aconteceu a partir de 2003;
    - Pimelomidae e Characidae;

# Introdução

---

- Criopreservação

A criopreservação consiste em conservar as células por longos períodos, a baixas temperaturas ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), sem que estas percam a sua viabilidade.



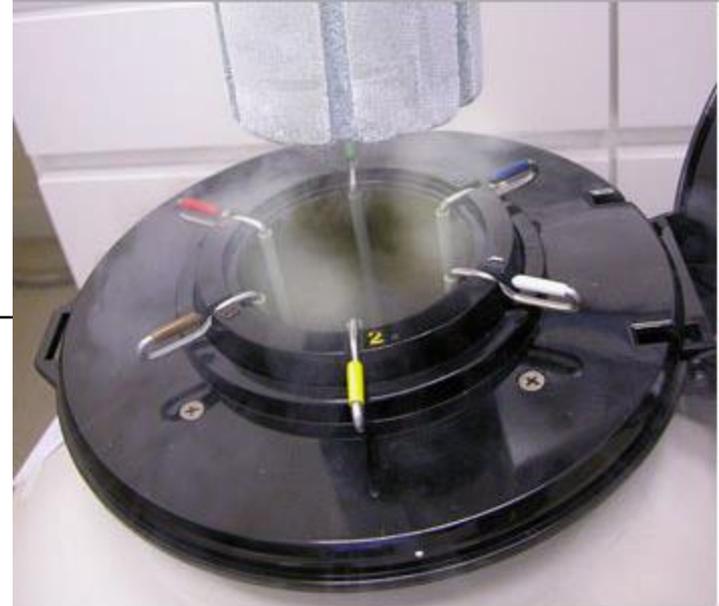
# INTRODUÇÃO

---

- Para submeter sêmen, ovócitos e embriões de peixes a baixas temperaturas é necessário o uso de soluções crioprotetoras (Harvey 1983)
  - Intracelular (Reichenbach et al., 2001)
    - **Metanol**, glicerol, dimetil-sulfóxido (DMSO), propileno-glicol e etileno-glicol
  - Extracelular (Denniston et al., 2000)
    - **sacarose**, glicose, lactose, polivinilpirrolidona (PVP), rafinose e manitol

# Criopreservação

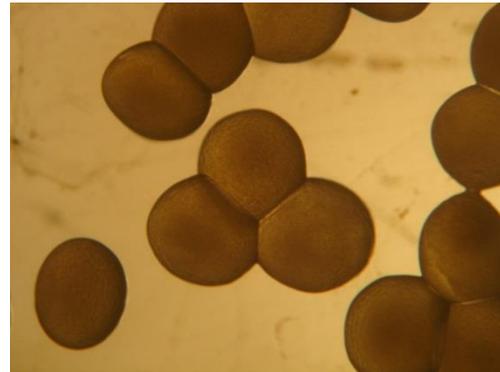
- Resfriamento
- Congelamento lento;
  - Redução gradual da temperatura.
  - Baixa concentração de ACP.
  - Ocorrência na formação de cristais de gelo.
- Congelamento rápido e ultra-rápido;
  - Entre lento e vitrificação.
  - Baixa concentração de ACP.
  - Redução de temperatura constante.
- Congelamento Vitrificação;
  - Rápida diminuição de temperatura (20.000 °C/min).
  - Altas concentrações de ACP.



# Criopreservação

---

- Sêmen
- Ovócito
- Embriões





# Criopreservação

---

- Crioprotetor
- Temperatura
- Processo

Gametas e embriões de alguns mamíferos já existe viabilidade!

# Criopreservação de sêmen

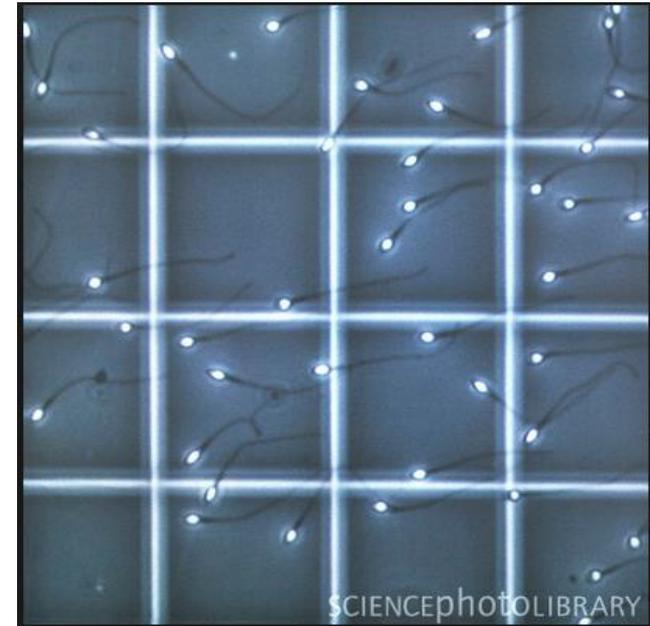
---

- Congelamento Lento;
  - Solução crioprotetora.
    - Solução Diluidora (80-90% da solução);
      - BTS, Hanks, ACP, entre outros.
    - Crioprotetor extracelular (5-10% da solução);
      - Glicose, Sacarose, Trealose e Frutose.
    - Crioprotetor intracelular (5-10% da solução);
      - DMSO, DMF, Etilenoglicol, Metanol, Glicerol.

# Criopreservação de sêmen

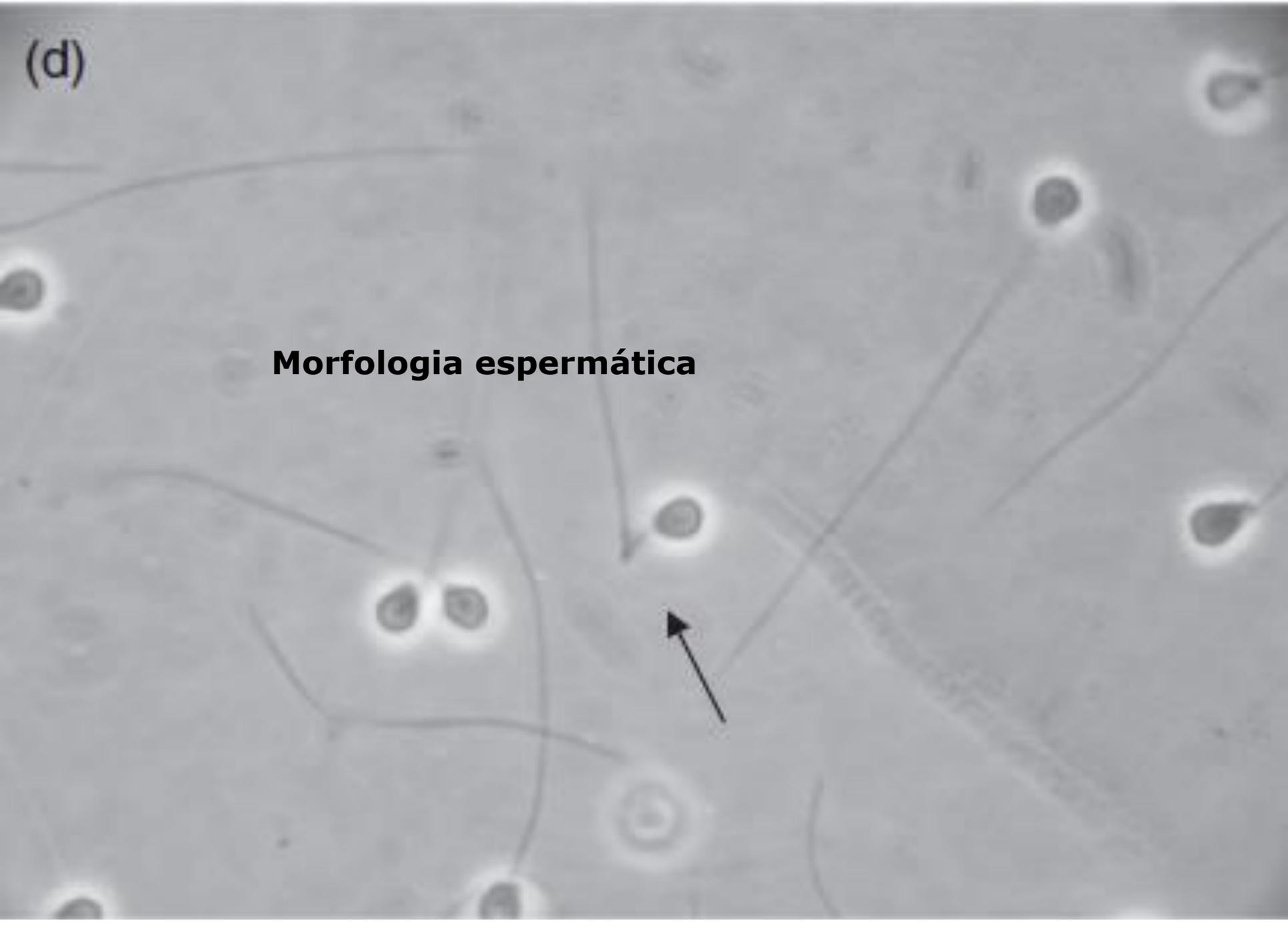
---

- Pré Congelamento;
  - Avaliação seminal;
    - Taxa de motilidade;
    - Tempo de motilidade;
    - Viabilidade espermática;
    - Concentração espermática;
    - Patologia espermática;



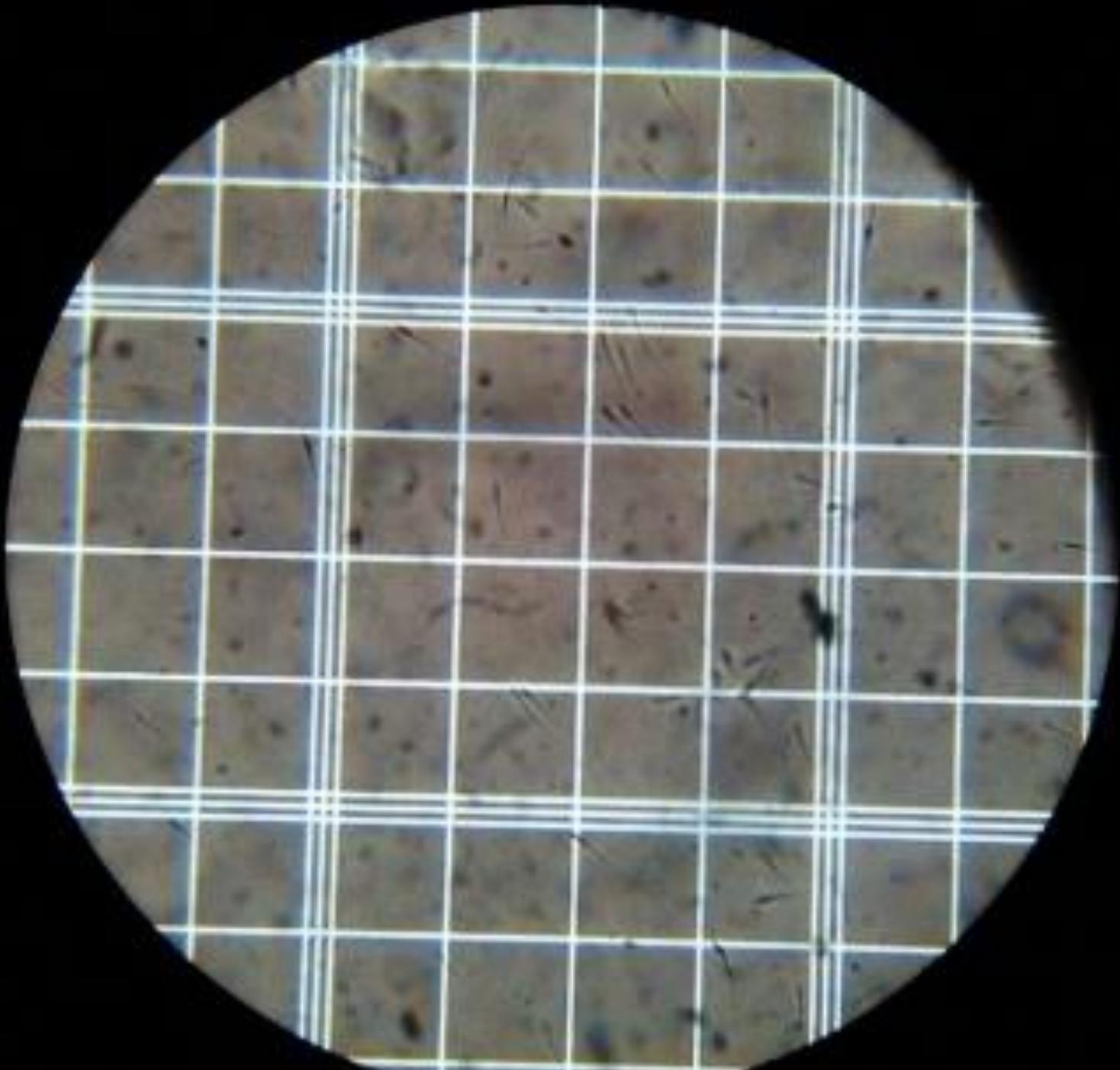
(d)

**Morfología espermática**





**Viabilidade espermática**

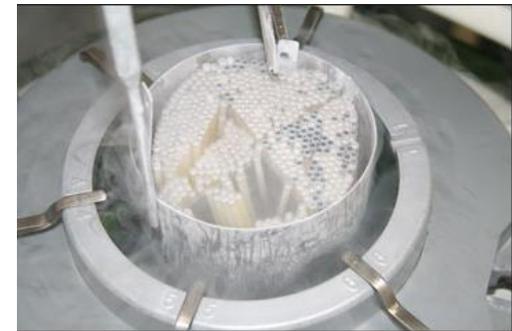


## Congelamento seminal;

- Diluição e homogeneização do sêmen com a solução crioprotetora;
- Diluição de acordo com o protocolo da espécie (S:D).

## Envasamento em palhetes;

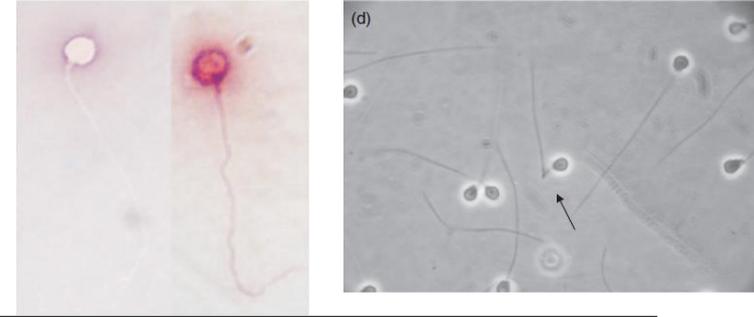
- Alocar os palhetes em botijão Dry Shipper (24 horas);
- Armazenamento em botijão contendo N<sub>2</sub>L.



- Descongelamento seminal;
- Retirada dos palhetes do botijão de  $N_2L$ ;
- Descongelamento em "banho-maria";
  - Temperatura entre 30-60 °C.
  - Tempo de 6-8 segundos.
- Secagem dos palhetes;
- Armazenamento em recipientes secos para futura utilização;
- Utilização mais rapidamente possível.

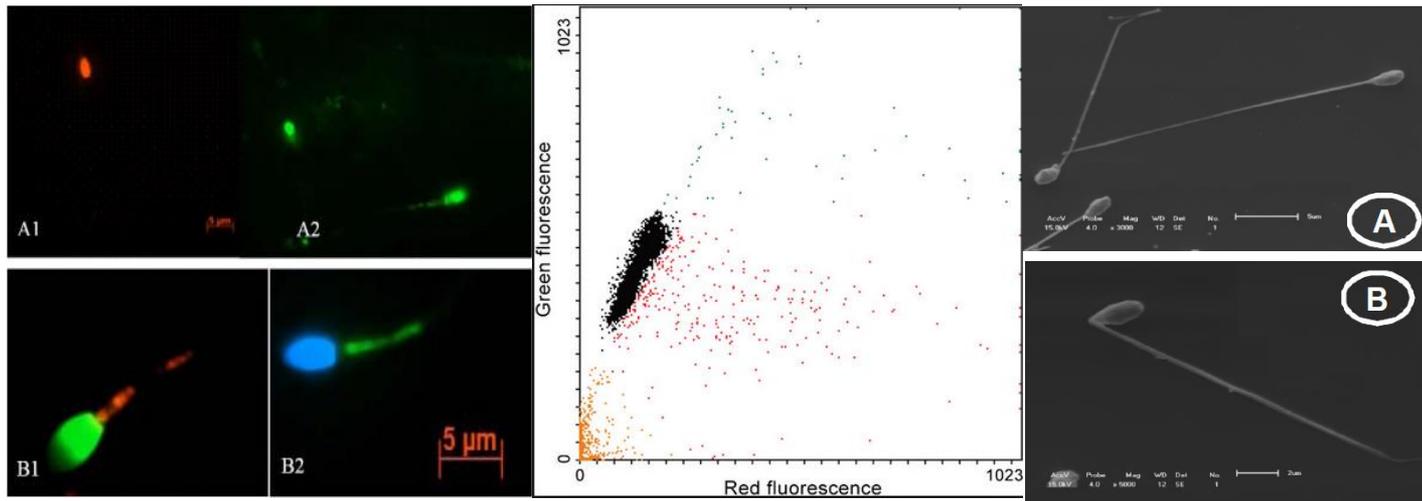
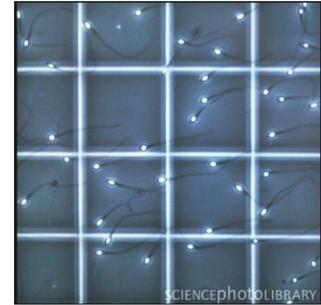


➤ Pós Congelamento;



➤ Avaliação seminal;

- Taxa de motilidade;
- Tempo de motilidade;
- Viabilidade espermática;
- Patologia espermática;
- Integridade funcional do espermatozoide.



# Criopreservação de sêmen

---

- Danos Causados pelo Congelamento;
  - Formação de cristais de gelo intra e extracelular;
  - Toxicidade dos ACP;
  - Estresse oxidativo;
  - Peroxidação lipídica da membrana celular;
  - Danos na estrutura da célula espermática;
  - Degradação do DNA

Gwo et al.; Streit Jr. et al., 2006-2009; Miliorini et al., 2011; Varela Jr. et al., 2012

# Criopreservação de sêmen

---

- Métodos para amenizar os danos;
  - Aumentar a eficiência do diluidor e dos crioprotetores utilizados;
  - Encontrar curvas de congelamento e descongelamento adequadas;
  - Não utilizar sêmen não ativado e/ou contaminado;
  - Utilizar o mais rapidamente possível.

# Criopreservação de sêmen

---

- ***Uso de sêmen congelado na pratica***
- Redução de custos e riscos de transporte de reprodutores;
- Redução no plantel de reprodutores e gastos com hormônios;
- Eliminação da assincronia na maturidade gonadal entre machos e fêmeas;
- Transporte de gametas de animais selecionados ou melhorados geneticamente;
- Criação de um banco de germoplasma;
- Armazenamento por tempo indeterminado.

# Criopreservação de sêmen

---

## ➤ ***Gargalos***

- Grande quantidade de espécies nativas;
- Variação entre a mesma espécie;
- Mão de obra para efetuar a técnica;
- Altos custos para utilização da técnica;
- Direcionamento dos centros de pesquisa;
- Falta de comunicação entre grupos de pesquisa e produtores.

# Desafios

---

- Elaboração de uma solução crioprotetora para espécies nativas;
  - Para cada espécie nativa.
- Padronização da técnica para espécies nativas comerciais;
- Reduzir custos da técnica;
- Uso rotineiro e efetivo da técnica de criopreservação.

# Utilização na prática

---

- Produção:
  - Uso e sêmen criopreservado na hibridação;
  - Ferramenta para o programa de melhoramento genético
    - Logística
    - Banco Germoplasma das gerações

# Protocolo básico

---

- 20 ml de gema de ovo
- 5 gramas de glicose
- 10 ml de DMSO ou Metanol
- Completar para 100% com água destilada



2006 2 23

















**SACAROSE**  
PA

**ALCOOL METILICO**  
(METANOL)  
P.A.-A.C.S.

T<sub>14</sub>

2006 2 15





# Embriões e ovócitos

---

Em peixes, a conservação de células pequenas, como o espermatozóide, é regularmente realizada com sucesso, em muitos laboratórios. No entanto a congelação de embriões e ovócitos de peixes ainda não foi solucionada, principalmente, por cinco motivos:

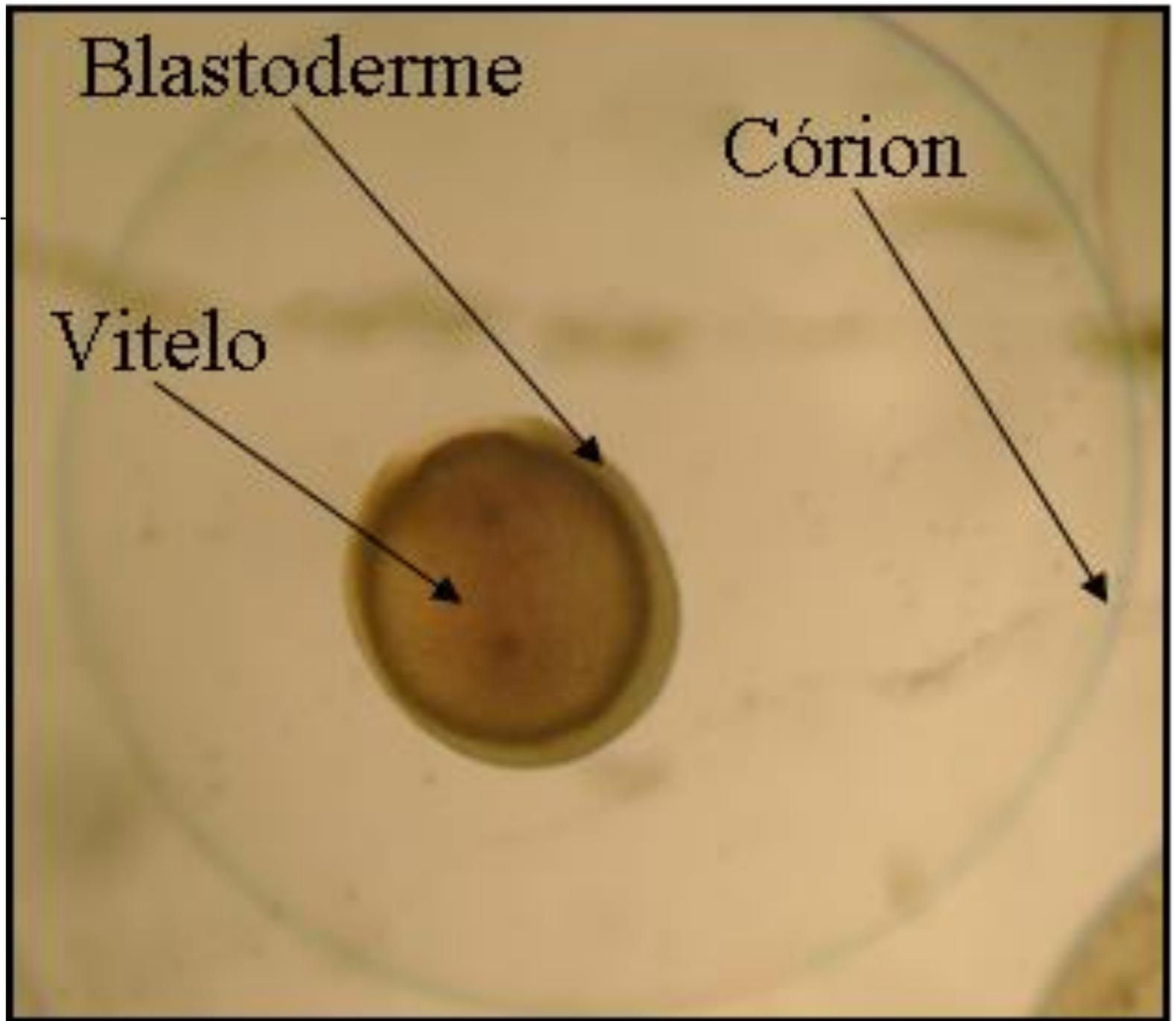
- (i) tamanho do ovo,
- (ii) grande tamanho das células: embrião e ovócito
- (iii) compartimentalização entre a blastoderme e o vitelo: embrião
- (iv) membranas semi-permeáveis como o córion: embrião
- (v) potencial de suscetibilidade do embrião e do ovócito a danos pelo resfriamento

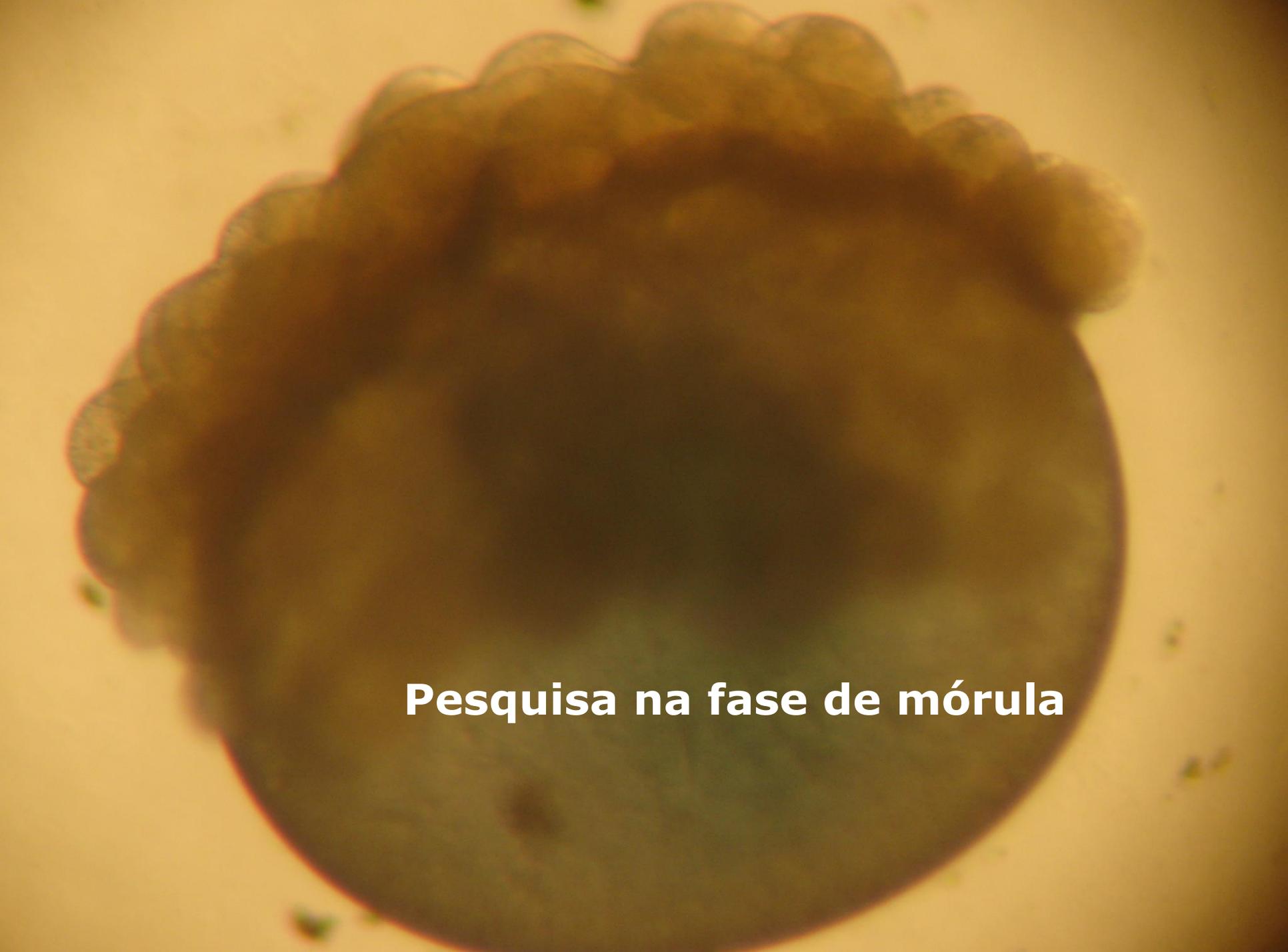
(Harvey, 1983; Stoss, 1983; Zhang e Rawson, 1995; Hagerdorn et al. 1997a; Ninhaus-Silveira et al., 2007; Fornari et al., 2012; Fornari et al., 2013).

Blastoderme

Córion

Vitelo



A microscopic image of a morula stage embryo, which is a spherical cluster of cells. The cells are arranged in a dense, multi-layered structure, typical of the morula phase of embryonic development. The overall appearance is a dark, rounded mass with a slightly irregular, scalloped edge. The background is a light, uniform color.

**Pesquisa na fase de mórula**



**Pesquisa na fase de  
fechamento do blastoporo**



**Pesquisa na fase de  
morfogêneses**

# Embriões e ovócito

---

- Para submeter embriões de peixes a baixas temperaturas é necessário o uso de soluções crioprotetoras (Harvey 1983)
  - Intracelular (Reichenbach et al., 2001)
    - **Metanol**, glicerol, dimetil-sulfóxido (DMSO), propileno-glicol e etileno-glicol
  - Extracelular (Denniston et al., 2000)
    - **sacarose**, glicose, lactose, polivinilpirrolidona (PVP), rafinose e manitol

# Embriões e ovócito

---

- Resultados com metanol associado a sacarose vêm sendo destacados
  - Fornari et al., 2011 (*Rhinelipis aspera*)
  - Fornari et al., 2012 (*P. mesopotamicus*)
  - Fornari et al., 2013 (*Salminus brasiliensis*)
  - Streit Jr. et al., 2007 (*P. mesopotamicus*)
  - Zhang e Rawson, 1995 (*Bario rerio*)
  - Ahammad et al. (2003) (*Cyprinius carpio*)

# Processo da criopreservação

---

- *Métodos de criopreservação e Agentes crioprotetores*
  - *Intracelulares e extracelulares*
- *Resfriamento*
- *Vitrificação*
  - *Ultra rápido*
- *Congelação*
  - *Curva de resfriamento*

# Processo da criopreservação

---

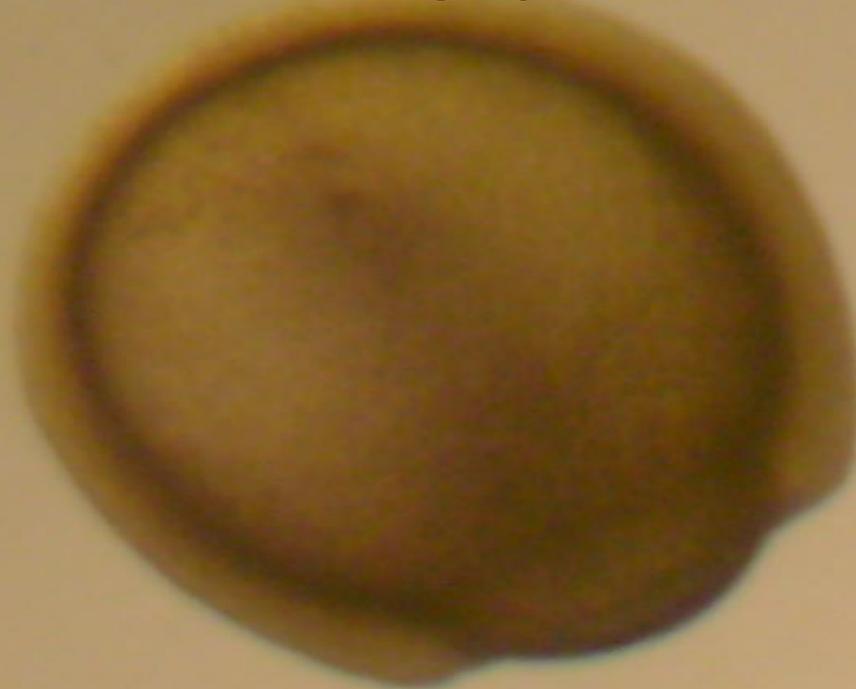
- Resfriamento
  - Curva lenta proposto por Ahammad et al. (2003)
  - Protocolo descrito por Streit Jr. et al. (2007)
- Vitrificação
  - Altas concentrações de crioprotetores em curto período de exposição (Zhang et al., 2005)
- Congelação
  - Aparelho de congelação “Biocom”
  - Curva lenta de resfriamento – queda 0,1 a 5°C/minuto
  - -6 a -7°C “seeding” →
  - -32 a -35°C estabilisa      Botijão N<sub>2</sub> líquido
    - Armazenado por tempo indeterminado (Caetano et al., 2011)

# Pesquisas com embriões

---

- ***Avaliar os processos de resfriamento, vitrificação e congelação em embriões de tambaqui (*Colossoma macropomum*) a fim de estabelecer protocolos de criopreservação.***

**Congelamento de embriões de tambaqui (*Colossoma macropomum*)**



# INTRODUÇÃO

---

- À biotecnologia da congelamento consiste em submeter embriões a queda gradual de temperatura, e durante o processo segue-se quatro etapas: submergir o embrião a solução crioprotetora; realizar o “seeding” (indução a cristalização que ocorre entre -7 e -9°C); estabilização da temperatura à pré transferência ao nitrogênio líquido (-32 a 35°C) e a descongelação.

# OBJETIVO

---

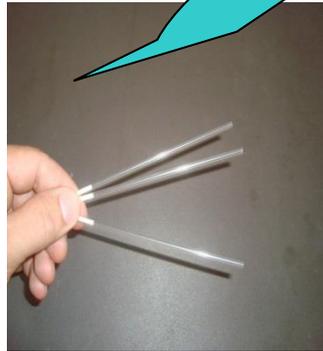
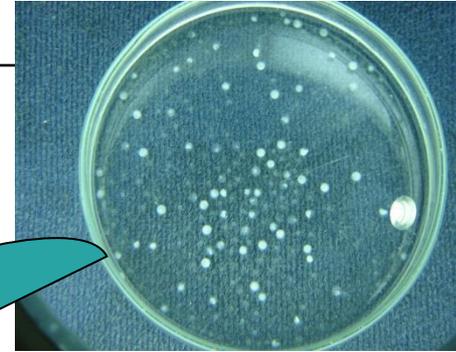
- **Avaliar injúrias e alterações morfológicas causadas nas distintas etapas do processo de criopreservação correlacionando diferentes curvas de resfriamento em embriões de *C. macropomum*.**

# MATERIAL E METODOS

---

- Baseado nos trabalhos de Streit Jr. et al. (2007) e Fornari et al. (2011) foi utilizado uma solução crioprotetora composta por metanol (10%) e sacarose (17%)

# MATERIAL E METODOS



Baseado nos trabalhos de Streit Jr. et al. (2007) e Fornari et al. (2011) utilizou-se uma solução crioprotetora composta por metanol (10%) e sacarose (17%)

**0,5°C/minuto até -  
7°C “seeding”  
armazenado em  
Nitrogênio -33°C**

# MATERIAL E METODOS

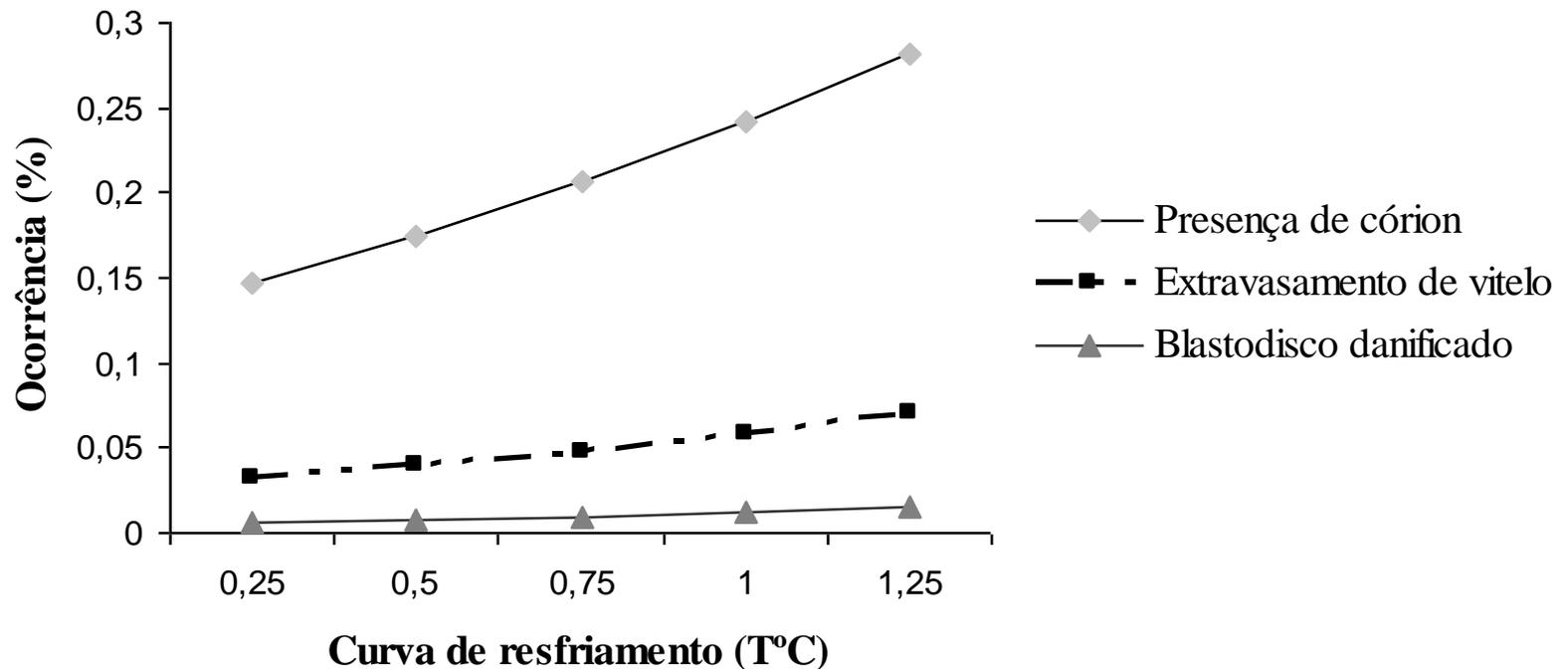
---

Durante o processo em todas as etapas uma amostragem aleatória de embriões foram retirados para análise em eletromicroscopia de varredura



# RESULTADO E DISCUSSÃO

## Curvas de resfriamento:



**Figura 2.** Probabilidade (%) de preservação de córion e ocorrência de injúrias (extravasamento de vitelo e blastoderme danificado) em embriões de *Colossoma macropomum* submetidos às curvas de resfriamento.

# RESULTADO E DISCUSSÃO

**Tabela 2.** Probabilidade (%) da presença de córion (PC) e das injúrias, vitelo extravasado (VE) e blastoderme danificado (BD) nas diferentes etapas do processo de congelação dos embriões de tambaqui (*Colossoma macropomum*).

Etapas da congelação	PC	**	VE	**	BD	*
Seeding (-7°C)	21	a	21	b	56	B
- 35°C	02	b	41	a	55	B
- 196°C	02	b	33	a	63	A

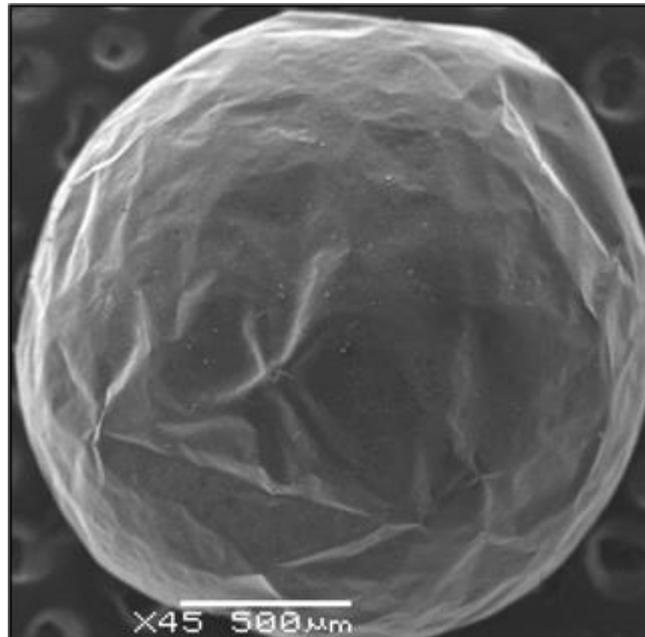
Diferença estatística (\* $p < 0,1$  e \*\* $p < 0,05$ ) representado por letras na coluna

# RESULTADO E DISCUSSÃO

---

## *Alterações morfológicas e injúrias*

### *Córion*

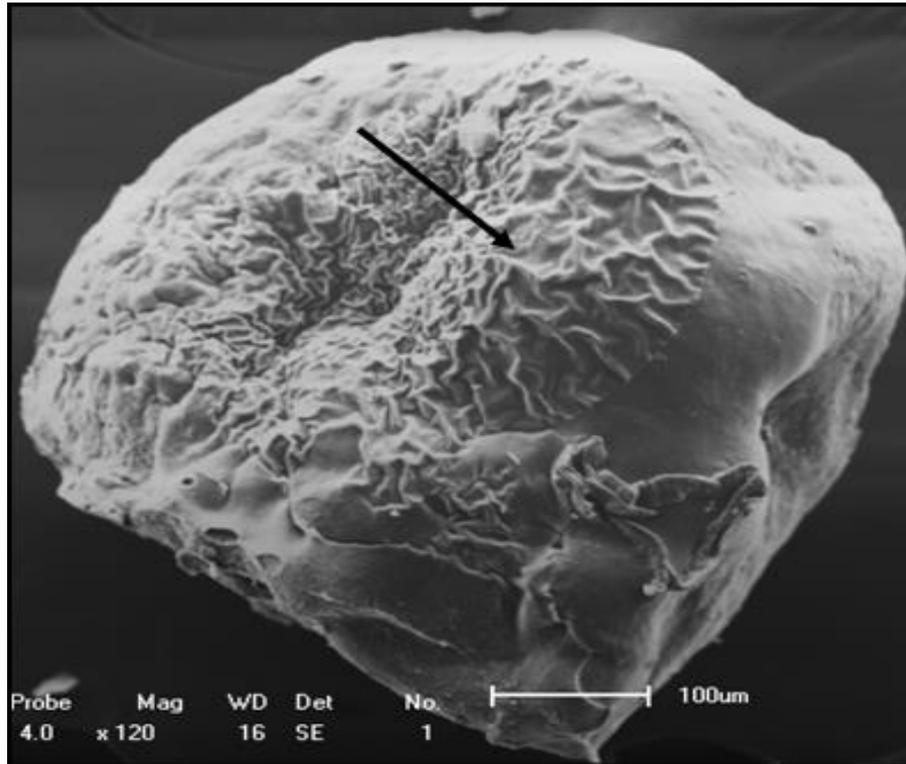


**Figura 3.** Imagem de microscopia de varredura mostrando o córion intacto do embrião de tambaqui (*Colossoma macropomum*).

# RESULTADO E DISCUSSÃO

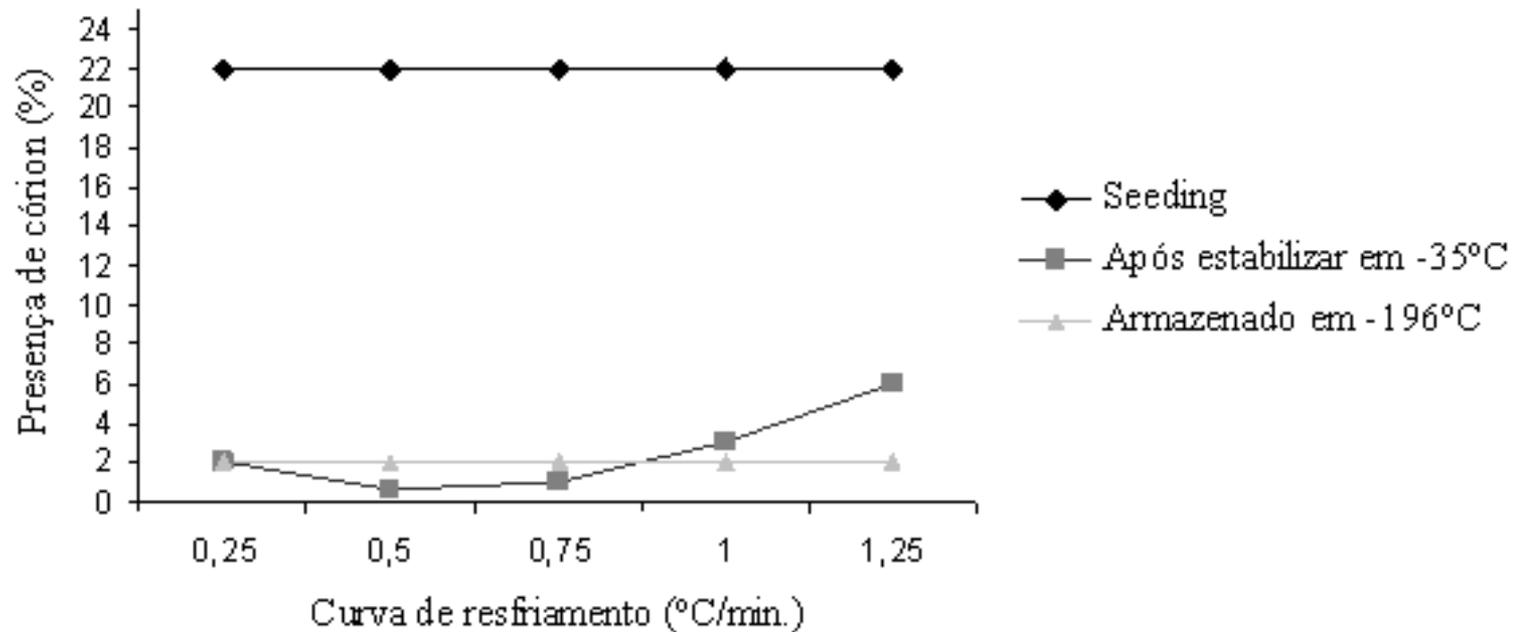
---

## *Ausência de Córion*



**Figura 4.** Imagem de microscopia de varredura mostrando ausência de córion em embrião de tambaqui (*Colossoma macropomum*) após o processo de criopreservação

# RESULTADO E DISCUSSÃO

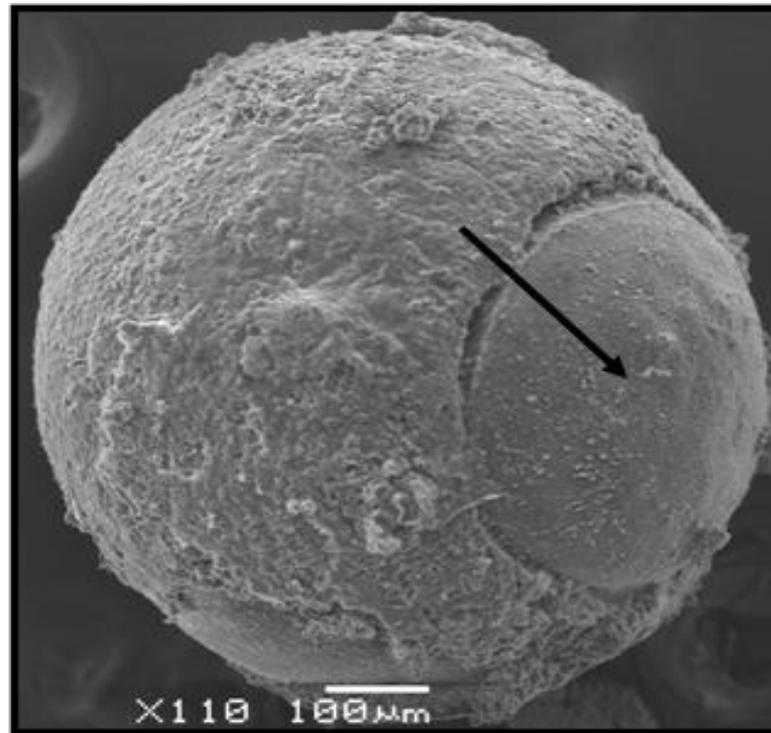


**Figura 5.** Probabilidade (%) de preservação do córion de embriões de *Colossoma macropomum* durante as etapas do processo de criopreservação em diferentes curvas de resfriamento.

# RESULTADO E DISCUSSÃO

---

## *Vitelo*



**Figura 6.** Imagem de microscopia de varredura mostrando o vitelo do embrião de tambaqui (*Colossoma macropomum*) após o processo de criopreservação.

# RESULTADO E DISCUSSÃO

---

*Vitelo*

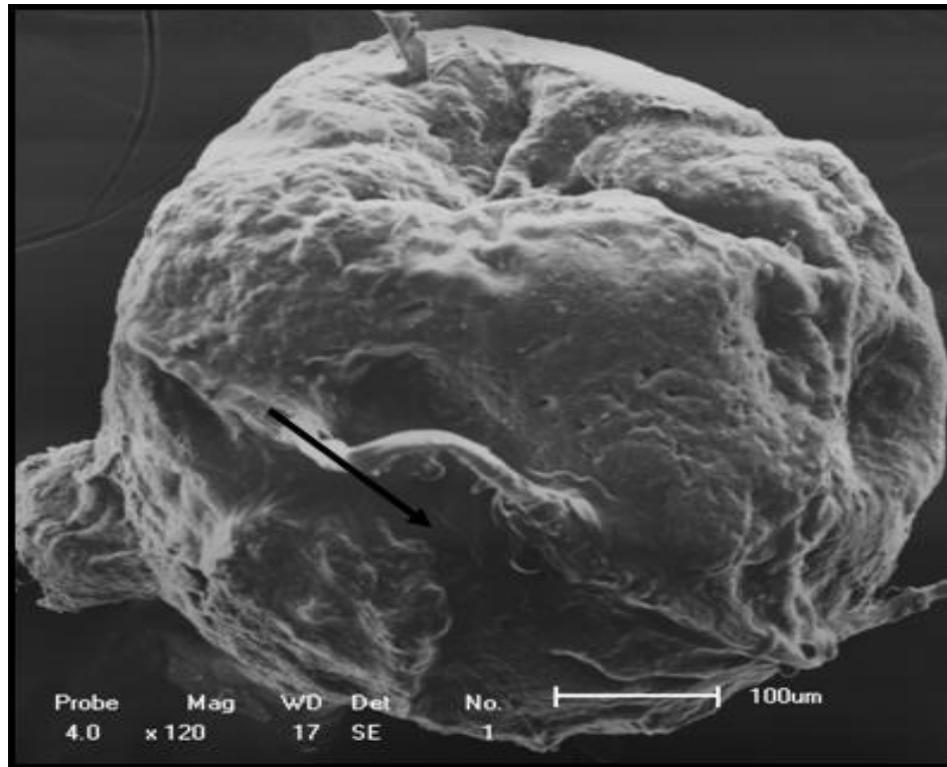
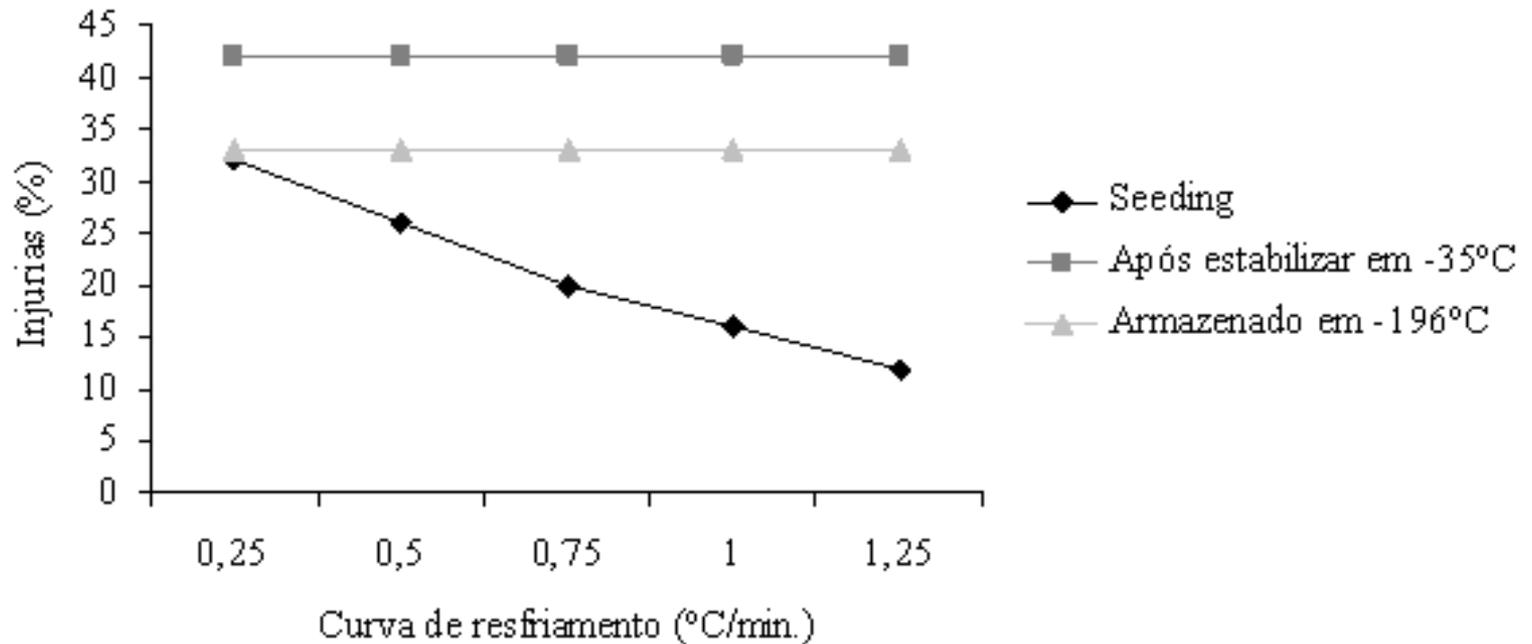


Figura 7. Imagem de microscopia de varredura mostrando injúrias no vitelo do embrião de tambaqui (*Colossoma macropomum*) após o processo de criopreservação.

# RESULTADO E DISCUSSÃO

## Vitelo

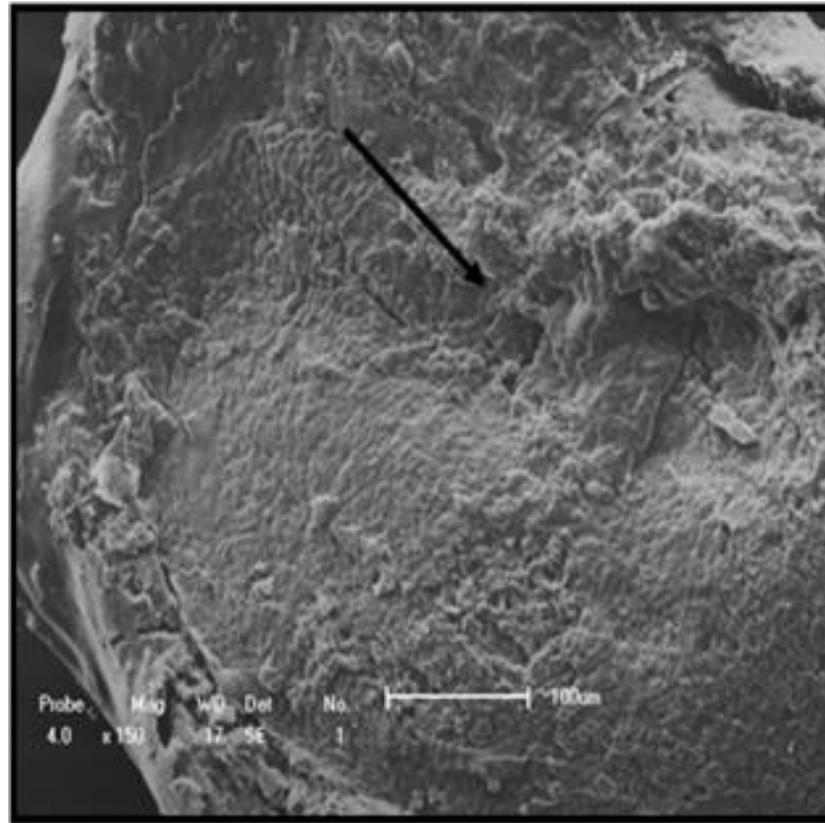


**Figura 8.** Probabilidade (%) de extravasamento de vitelo em embriões de *C. macropomum* durante as etapas do processo de criopreservação em diferentes curvas de resfriamento.

# RESULTADO E DISCUSSÃO

---

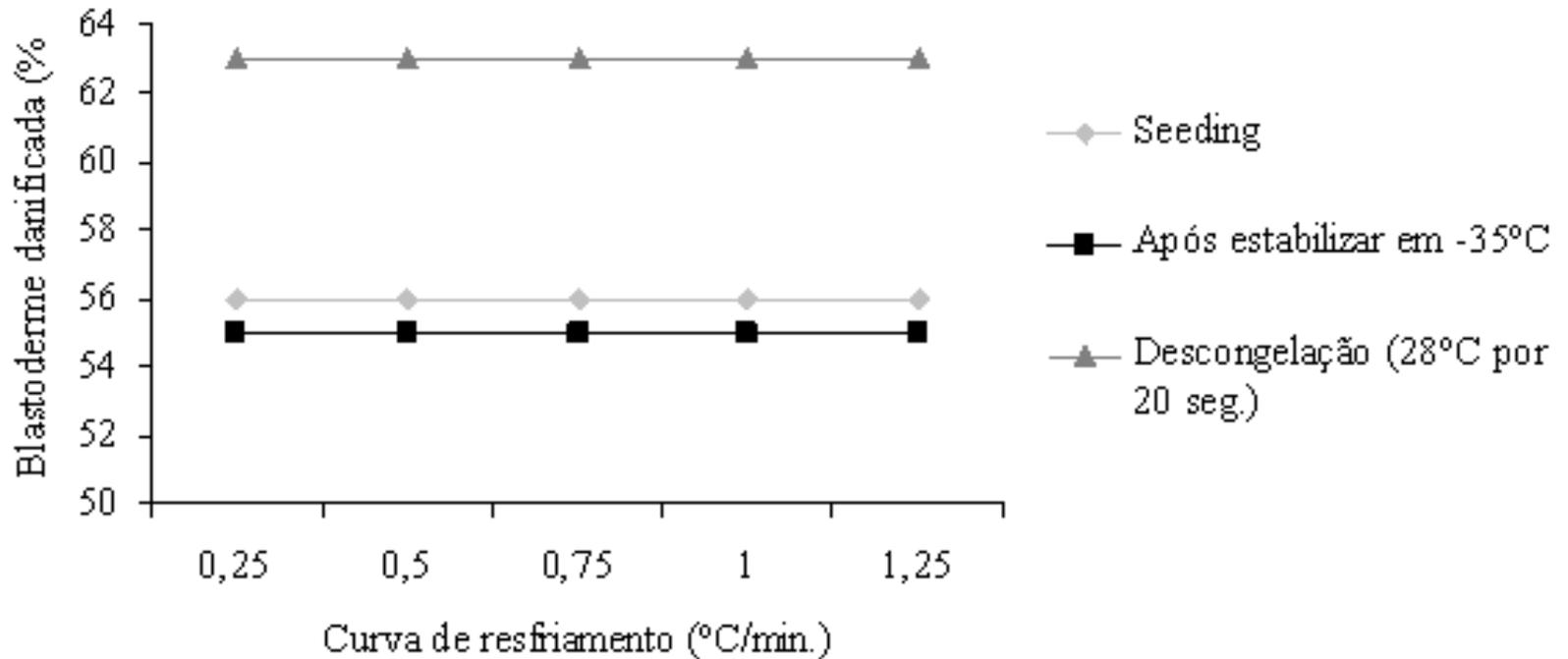
## ***Blastoderme***



**Figura 9.** Imagem de microscopia de varredura mostrando injúrias no blastoderme de embrião de tambaqui (*Colossoma macropomum*) após o processo de criopreservação.

# RESULTADO E DISCUSSÃO

## *Blastoderme*



**Figura 10.** Probabilidade (%) de injúrias no blastoderme de embriões de *Colossoma macropomum* durante as etapas do processo de criopreservação em diferentes curvas de resfriamento.

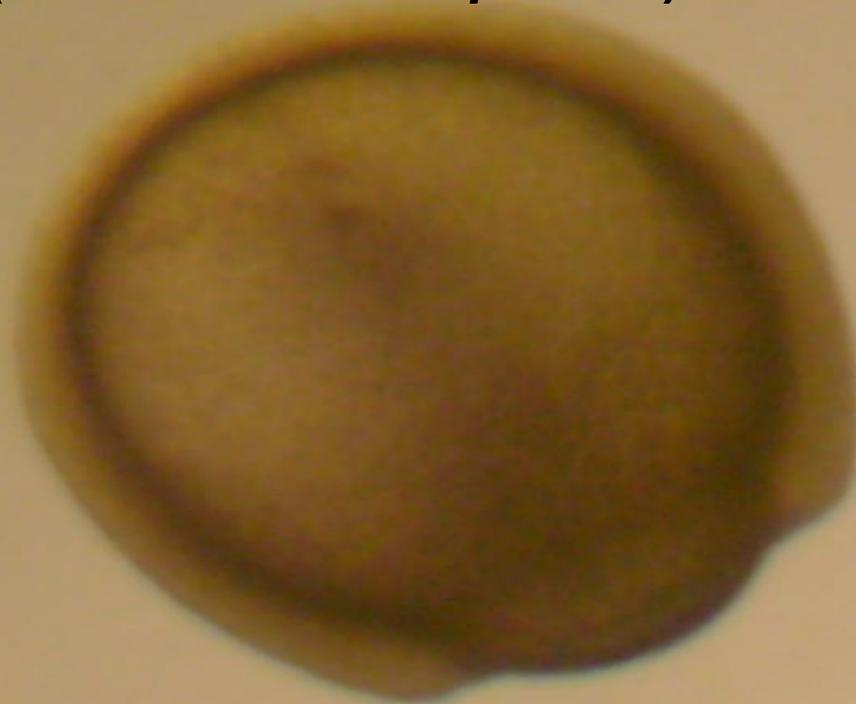
# Conclusão

---

A ocorrência da formação de cristais de gelo não foi evitada e conseqüentemente vários danos morfológicos inviabilizaram os embriões de tambaqui (*Colossoma macropomum*).

No entanto, alguns pontos do processo puderam ser avaliados como: aumento da curva de resfriamento verificou-se maior probabilidade de preservação de córion ao estabilizar em  $-35^{\circ}$  na curva de resfriamento com maior queda, outro ponto, até ao momento do “seeding” observou-se maior probabilidade de preservação de córion indiferente da curva de resfriamento.

**Solução Crioprotetora para vitrificação de embriões de tambaqui  
(*Colossoma macropomum*)**



# INTRODUÇÃO

---

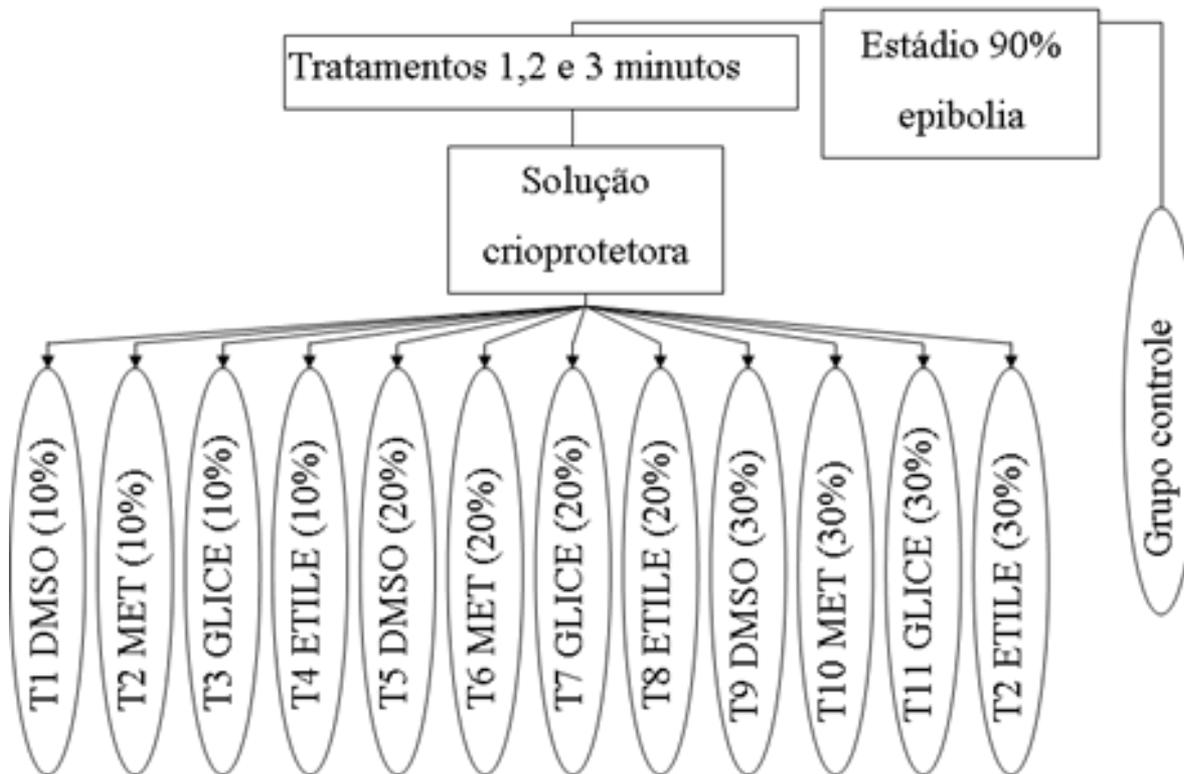
- A vitrificação consiste em submeter o embrião à alta concentração de crioprotetor por curto período de exposição, e em imediato submetê-los ao nitrogênio líquido, processo de congelamento “ultra rápido”.

# OBJETIVO

---

- Foi avaliar embriões de *C. macropomum* expostos à soluções crioprotetoras quanto a toxidez e posteriormente desenvolver um protocolo de vitrificação.

# MATERIAL E METODOS



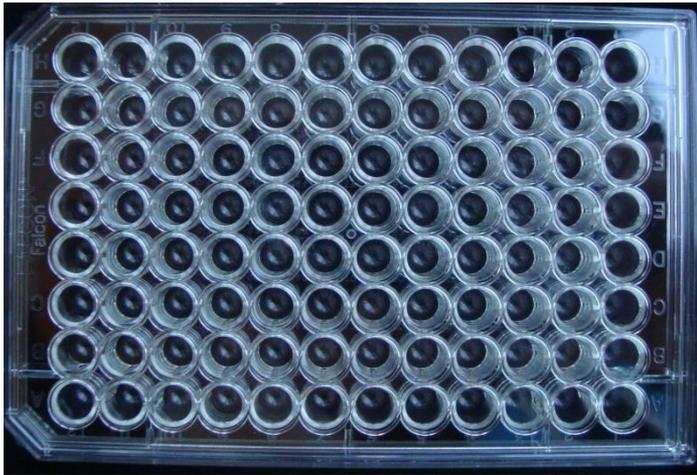
**Figura 1.** Esquema dos tratamentos para o teste de toxicidade em embriões de *C. macropomum*, submetidos à crioprotetores. DMSO (Dimetil-sulfóxido), MET (metanol), GLICE (glicerol) e ETILE (eilenoglicol).

# MATERIAL E METODOS

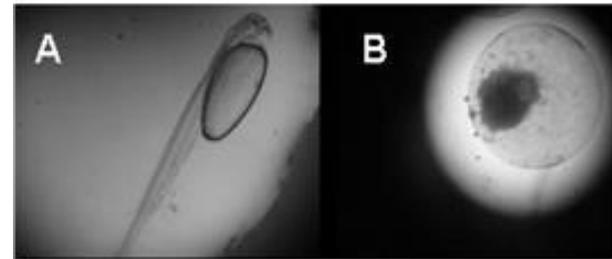
---

- ***Avaliação da toxidez da solução crioprotetora***

**Avaliação da taxa de eclosão em placas de acrílico**



**Taxa de eclosão**

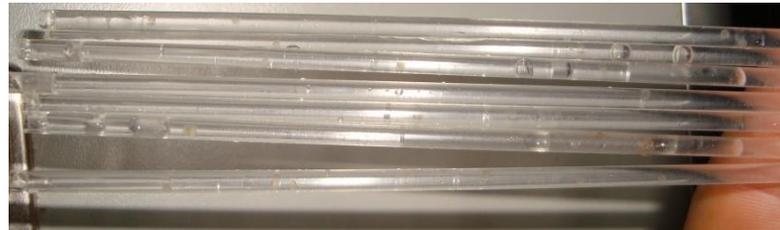


# MATERIAL E METODOS

Soluções, alta concentração de crioprotetores



Curto período de exposição



Imediatamente submetido a  $-196^{\circ}\text{C}$



Descongelados ( $30^{\circ}\text{C}$ , 20 segundos) para avaliar a eclosão



# MATERIAL E METODOS

---

## *Microscopia eletrônica de varredura*

- **Após a descongelamento dos embriões submetidos à vitrificação, cinco de cada tratamento foram processados.**
- **Para avaliação das alterações morfológicas, amostras de cada tratamento foram fixadas em solução de Glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato 0,1M em pH 7,2.**

# Resultados

---

- ***Toxidez dos crioprotetores***

Tabela 1. Probabilidade de eclosão de larvas de *C. macropomum* após teste de toxidez com diferentes crioprotetores.

<b>Tratamento</b>	<b>Eclosão (%)</b>
Controle	89
DMSO	30b
Metanol	53a
Glicerol	12c
Etilenoglicol	0,7c

**Mesmas letras em cada coluna indicam igualdade pelo teste t. ( $p > 0,05$ ).**

# Resultados

## ○ *Toxidez do DMSO*

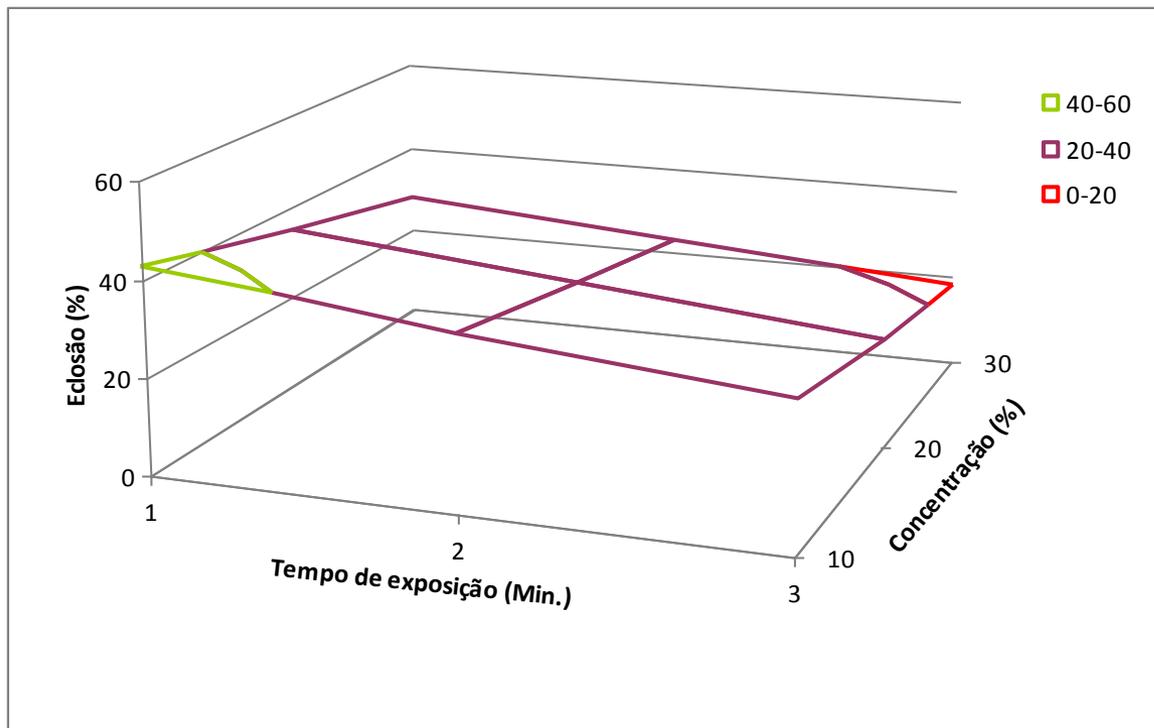


Figura 4. Toxidez de diferentes concentrações de DMSO combinado com diferentes tempos de exposição dos embriões de *Colossoma macropomum*, na taxa de eclosão das larvas.

# Resultados

## ○ *Toxidez do metanol*

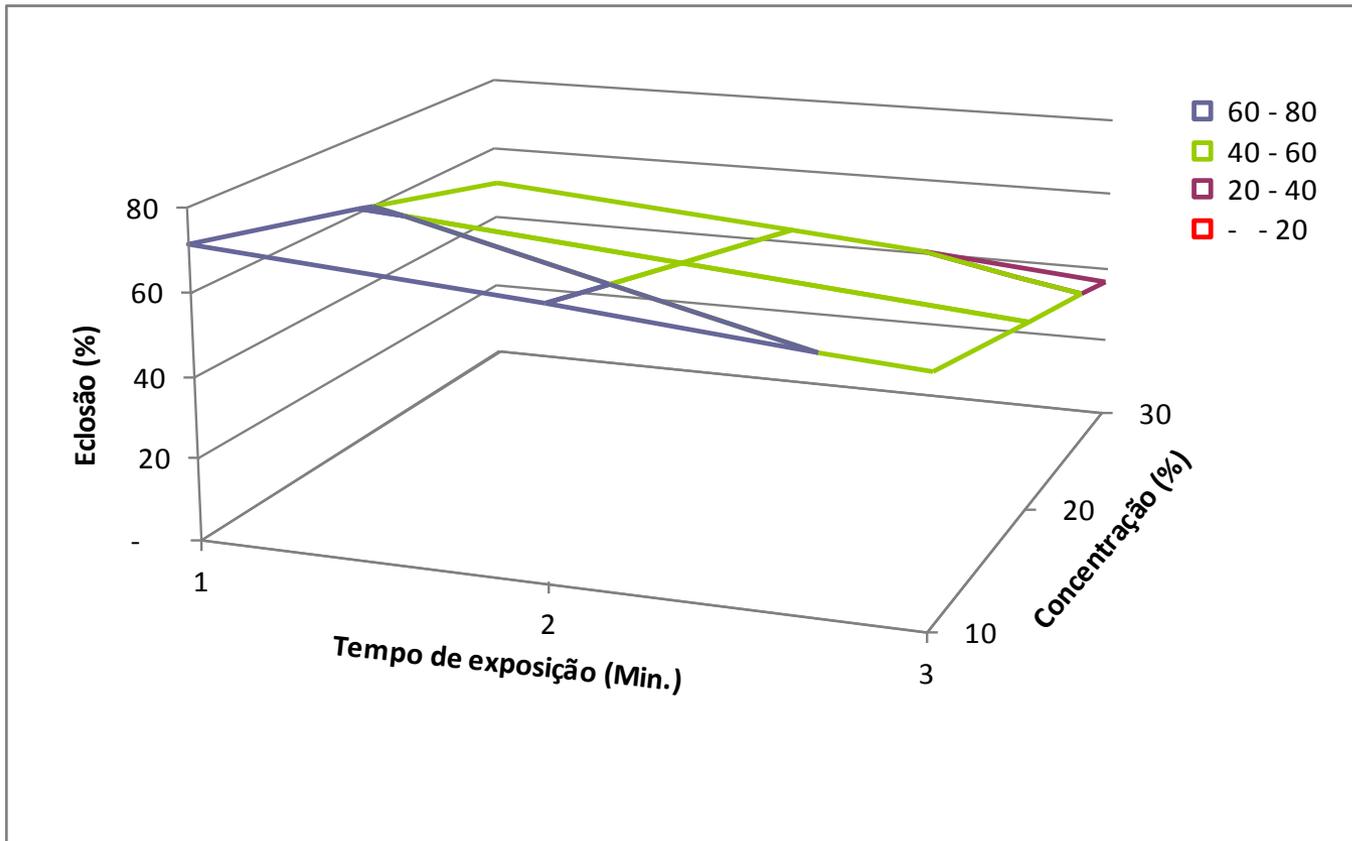


Figura 5. Toxidez de diferentes concentrações de metanol combinado com diferentes tempos de exposição dos embriões de *Colossoma macropomum*, na taxa de eclosão das larvas.

# Resultados

## ○ **Toxidez do glicerol**

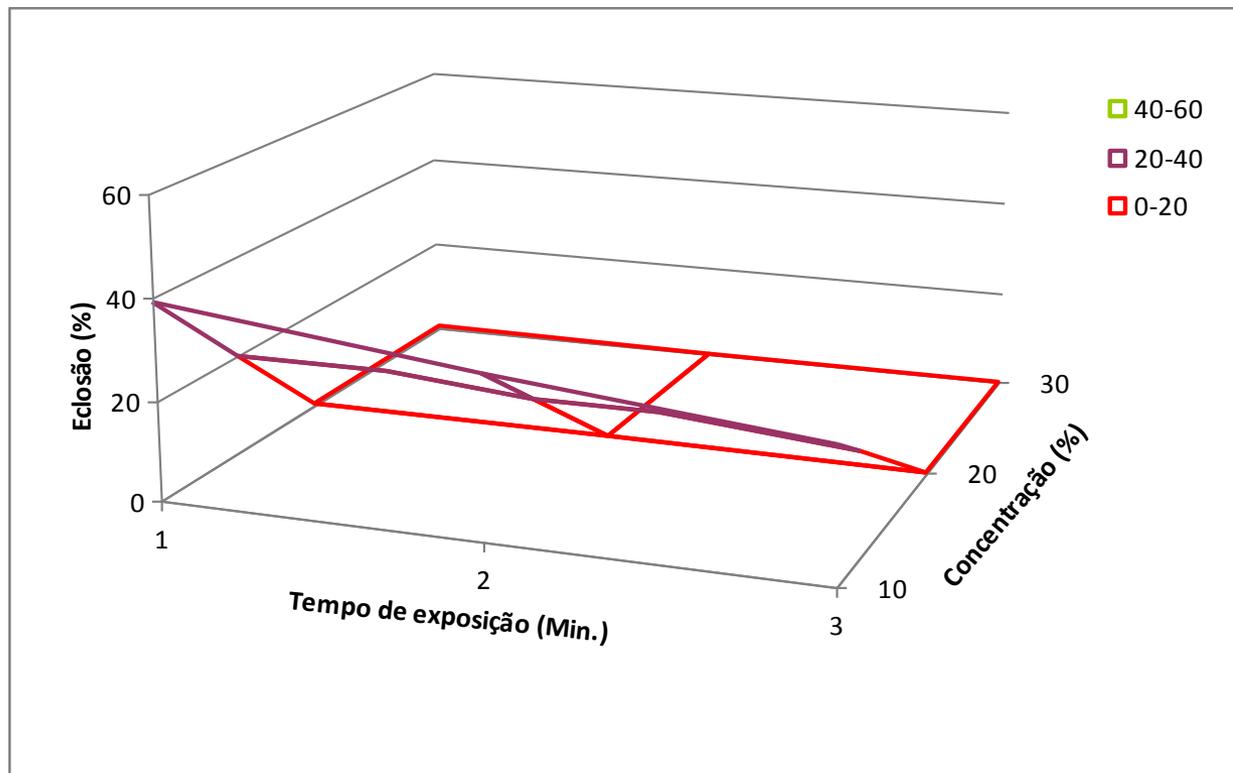


Figura 6. Toxidez de diferentes concentrações de glicerol combinado com diferentes tempos de exposição dos embriões de *Colossoma macropomum*, na taxa de eclosão das larvas.

# Resultados

## ○ *Toxidez do etilenoglicol*

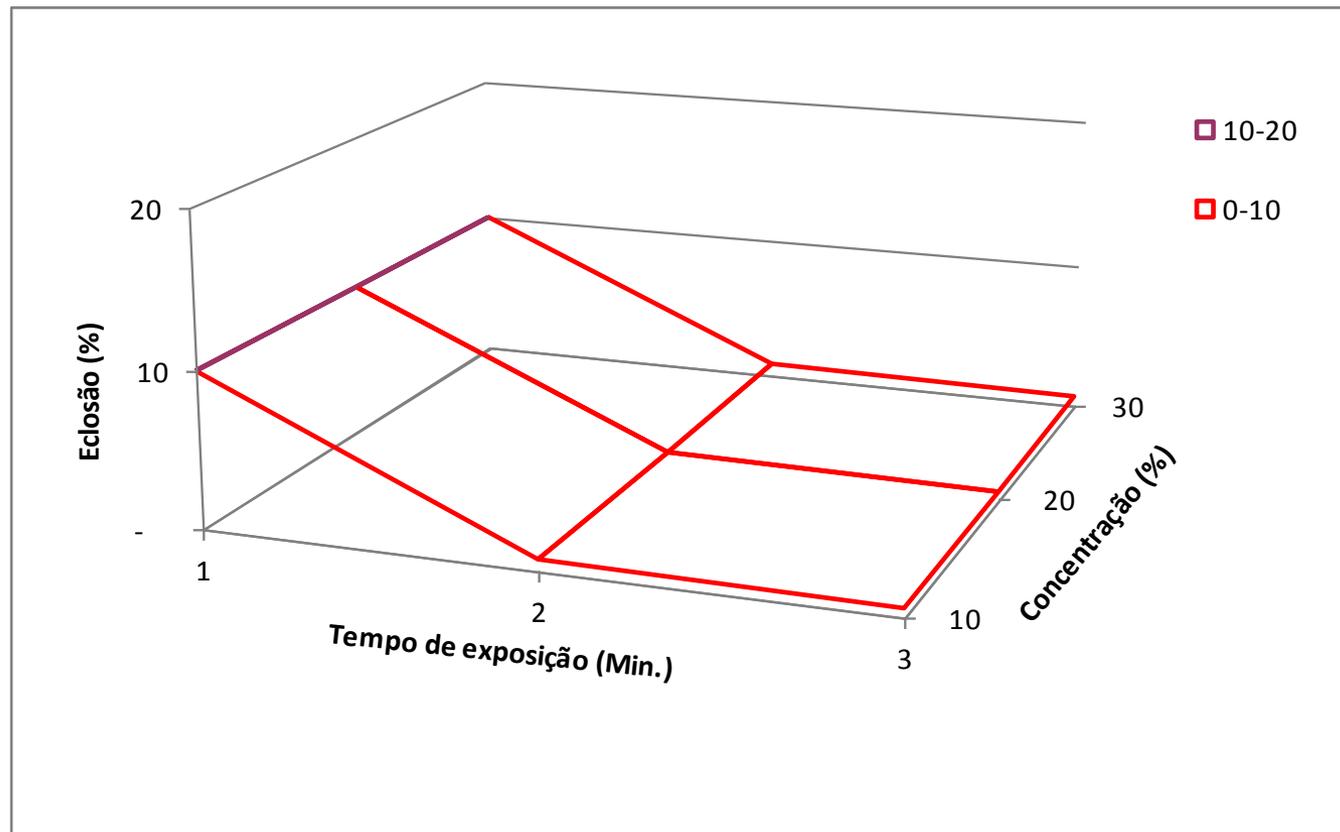


Figura 7. Toxidez de diferentes concentrações de etilenoglicol combinado com diferentes tempos de exposição dos embriões de *Colossoma macropomum*, na taxa de eclosão das larvas.

# Resultados

---

## ○ **Vitrificação dos embriões**

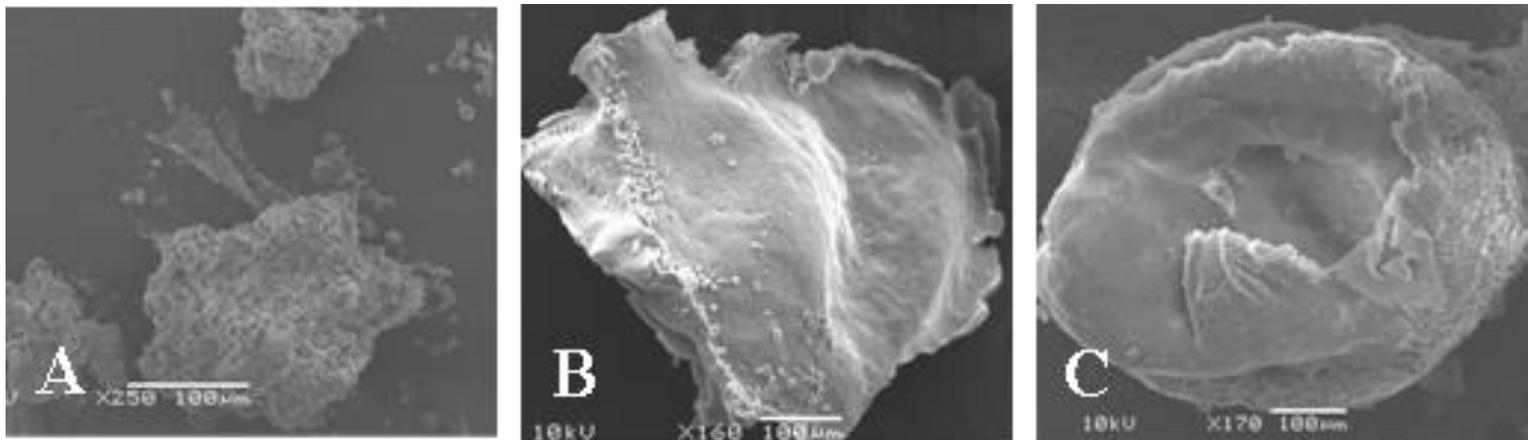
Tabela 2. Ocorrência (%) de injurias causada pelo processo de vitrificação de embriões de *C. macropomum*, durante dois minutos em 20% dos crioprotetores DMSO e metanol.

Compartimento do embrião	CRIOPROTETORES	
	DMSO	Metanol
Córion destruído	60 <sup>a</sup>	35b*
Vitelo extravasado	40 <sup>a</sup>	10b**
Blastoderme danificado	90a	81b*

Letras minúsculas diferentes em cada linha indicam existir diferença significativa entre os tratamentos \*p<0,06 \*\*p<0,05.

# Resultados

- **Imagens de microscopia de varredura dos embriões após o processo de vitrificação**



**Figura 3 – Eletromicrografia de varredura de embriões de *C. macropomum*, após congelação e descongelação sem crioprotetor;**

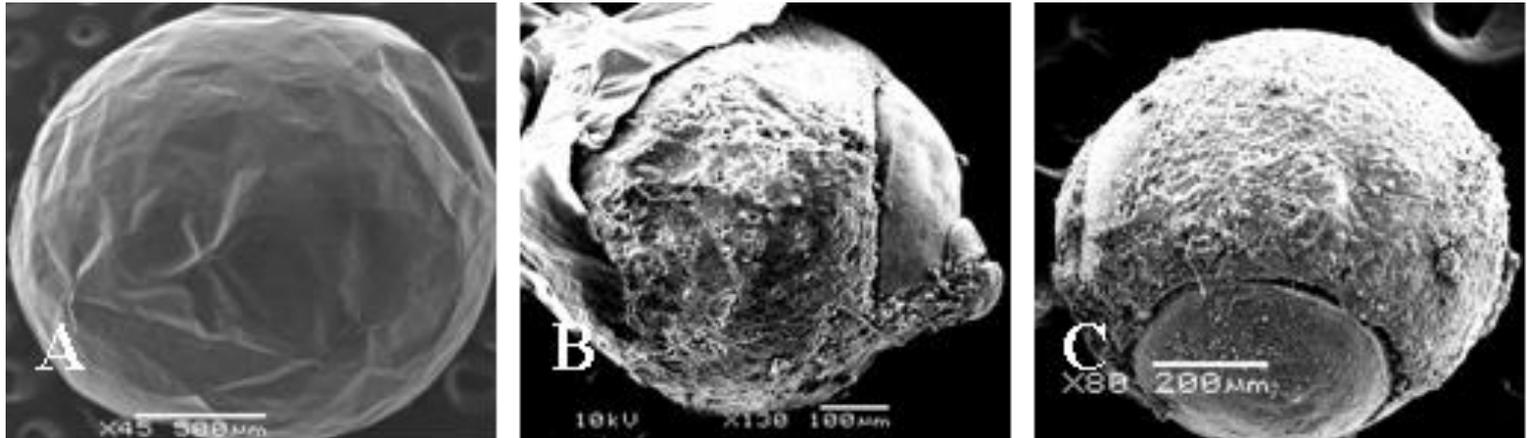
**A – blastoderme com células destruídas;**

**B – embrião com vitelo desconfigurado e blastoderme ausente;**

**C – Vitelo extravasado e blastoderme danificado.**

# Resultados

---



**Figura 4 – Eletromicrografia de varredura de embriões de tabaqui (*C. macropomum*) após congelação e descongelação utilizando solução crioprotetora contendo 30% de metanol;**

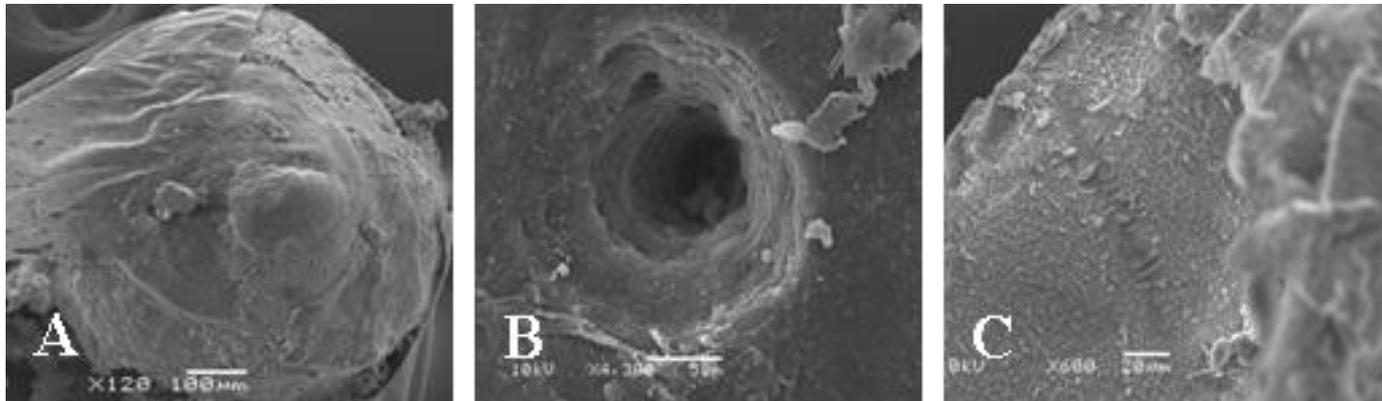
**A – embrião com córion intacto;**

**B – embrião com córion retirado manualmente, blastoderme danificada;**

**C – Embrião na fase do fechamento do blastóporo apresentando injurias celulares.**

# Resultados

---



**Figura 5 – Eletromicrografia de varredura de embriões de tambaqui (*C. macropomum*) após congelamento e descongelamento utilizando solução crioprotetora contendo 30% de DMSO na imagem A; 30% de etilenoglicol na imagem B e 30% de glicerol na imagem C.**

**A – embrião com blastoderme danificada e córion destruído;**

**B – micropróros com injúrias;**

**C – vitelo aparentemente danificado.**

# CONCLUSÃO

---

- **A exposição dos embriões por um período maior que dois minutos nas soluções contendo etilenoglicol, glicerol e DMSO em concentrações acima de 20%, torna-se tóxico para embriões de *C. macropomum*. Por outro lado o metanol na concentração de 30% em curto período de exposição (um minuto) a toxidez foi menor que as demais combinações testadas, resultando em potencial crioprotetor para estudos do processo de vitrificação. Além disso, observou-se menores probabilidades de ocorrência de injurias aos embriões vitrificados com metanol a 20%.**



**Protocolo de resfriamento para embriões de  
tambaqui *Colossoma macropomum***

# INTRODUÇÃO

---

- **Um aspecto importante da pesquisa com resfriamento está relacionado à capacidade criopreservante dos crioprotetores identificados nos testes de resfriamento, principalmente porque nesse processo, trabalha-se com a faixa de temperatura crítica para a sobrevivência do embrião.**
- **O efeito benéfico dos crioprotetores aos embriões em temperaturas negativas, de acordo com Mazur (1977), está no momento de submeter uma suspensão celular contendo crioprotetores à temperatura ao redor de  $-5^{\circ}\text{C}$ .**

# INTRODUÇÃO

---

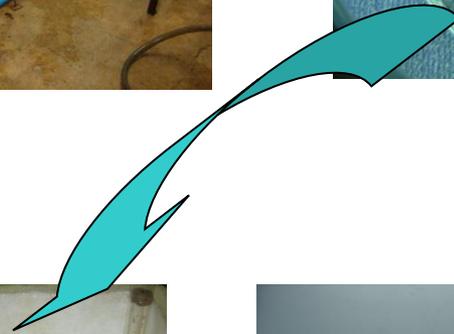
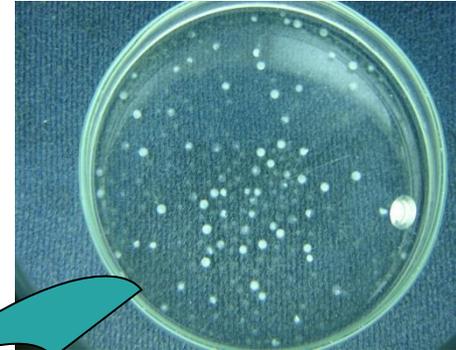
- **O resfriamento, trata-se de uma biotecnologia que preserva o embrião por curto período em baixas temperaturas, geralmente antes do ponto de congelamento.**
- **A queda de temperatura ocorre de forma gradual.**
- **As aplicações práticas são inúmeras.**
  - **Resgate em ambientes poluídos**
  - **Sincronização em laboratório**
  - **Transporte para troca de material genético**
  - **Pesquisa**

# OBJETIVO

---

- **Testar diferentes soluções crioprotetoras a fim de estabelecer um protocolo de resfriamento a  $-8^{\circ}\text{C}$ /seis horas para embriões de *C. macropomum*.**

# MATERIAL E METODOS



# MATERIAL E METODOS

**Tabela 1. Composição (%) das soluções crioprotetoras usadas no resfriamento de embriões de tambaqui (*C. macropomum*).**

Tratamento	Crioprotetor					Água <sup>(6)</sup>
	Sac <sup>(1)</sup>	Eti <sup>(2)</sup>	Gli <sup>(3)</sup>	Met <sup>(4)</sup>	DMSO <sup>(5)</sup>	
1	17,1	9	-	-	-	73,9
2	17,1	-	9	-	-	73,9
3	17,1	-	-	9	-	73,9
4	17,1	-	-	-	9	73,9
5	8,55	9	-	-	-	73,9
6	8,55	-	9	-	-	73,9
7	8,55	-	-	9	-	73,9
8	8,55	-	-	-	9	73,9
9 (controle)	-	-	-	-	-	100

<sup>1</sup>sacarose, <sup>2</sup>etilenoglicol, <sup>3</sup>glicerol, <sup>4</sup>metanol, <sup>5</sup>dimetilsulfóxido, <sup>6</sup>água destilada

# MATERIAL E METODOS

---

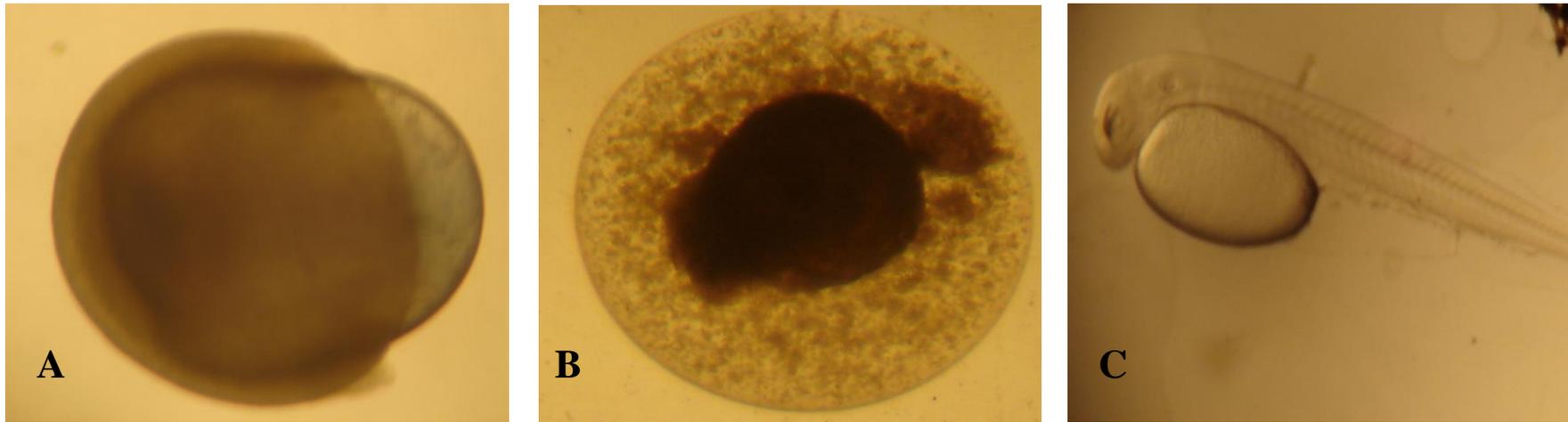


Figura 1: A- Estádio 75% de epibolia (fechamento do blastóporo); B- Ovo gorado; C- Larva viva. Imagens obtidas através de um esteriomicrocópio com auxílio de uma câmera digital 7,2 mega pixels.

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

- Taxa de fecundação:  $88,60 \pm 8,2$
- Embriões selecionados viáveis:  $93,40 \pm 2,14\%$

Segundo Lahnsteiner (2008) a qualidade dos embriões tem estreita correlação a resistência a baixas temperaturas e a toxidez dos crioprotetores.

Mortalidade dos embriões ainda no palhete



**Figura 2.** Palhetes com embriões de *C macropomum* após o resfriamento e descongelamento. 2A: coloração translúcida; 2B coloração esbranquiçada (setas).

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

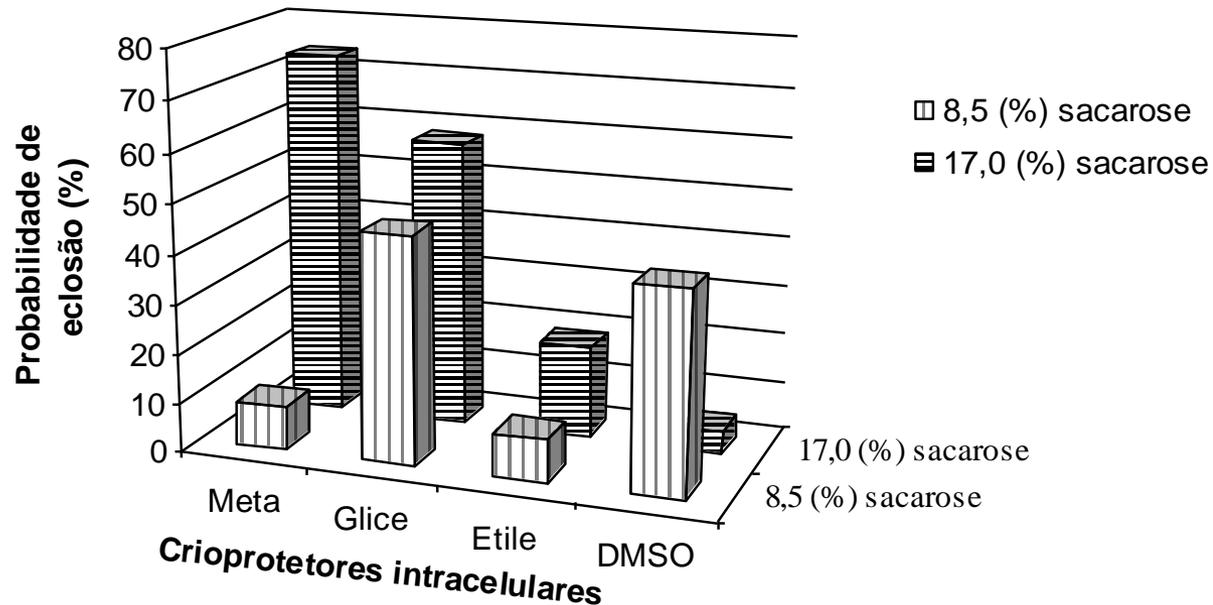
**Tabela 2.** Taxa de eclosão de larvas de *Colossoma macropomum* submetidas a diferentes soluções crioprotetoras estocadas a  $-8^{\circ}\text{C}$ /seis horas.

Sacarose (%)	Crioprotetores (10%)			
	Metanol	Glicerol	Etilenoglicol	DMSO
8,5	8,54 <sup>Bb</sup>	47,09 <sup>a</sup>	9,62 <sup>b</sup>	41,84 <sup>Aa</sup>
17,0	77,66 <sup>Aa</sup>	58,23 <sup>b</sup>	19,68 <sup>c</sup>	4,21 <sup>Bd</sup>
Controle*	0,00			

Mesmas letras maiúsculas em cada coluna e minúsculas em cada linha indicam diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

\* Apenas água destilada sem crioprotetores.

# RESULTADOS E DISCUSSÃO



**Figura 3.** Probabilidade (%) de eclosão de embriões de *C. macropomum* após o resfriamento e estocados por seis horas em diferentes soluções contendo 10% de metanol (Meta); glicerol (Glice), etilenoglicol (Etile) e dimetilsulfóxido (DMSO) associado a duas concentrações de sacarose 8,5 e 17,0%.

# CONCLUSÃO

---

- **Para o resfriamento de embriões de *C. macropomum* sugere-se o protocolo de armazenamento de seis horas em temperaturas de  $-8^{\circ}\text{C}$ , utilizando a solução crioprotetora de metanol (10%) com adição de sacarose (17%).**



# Novas pesquisas

---

- Salmão
- Peixes nativos





**Stopmilt e ativador espermático**



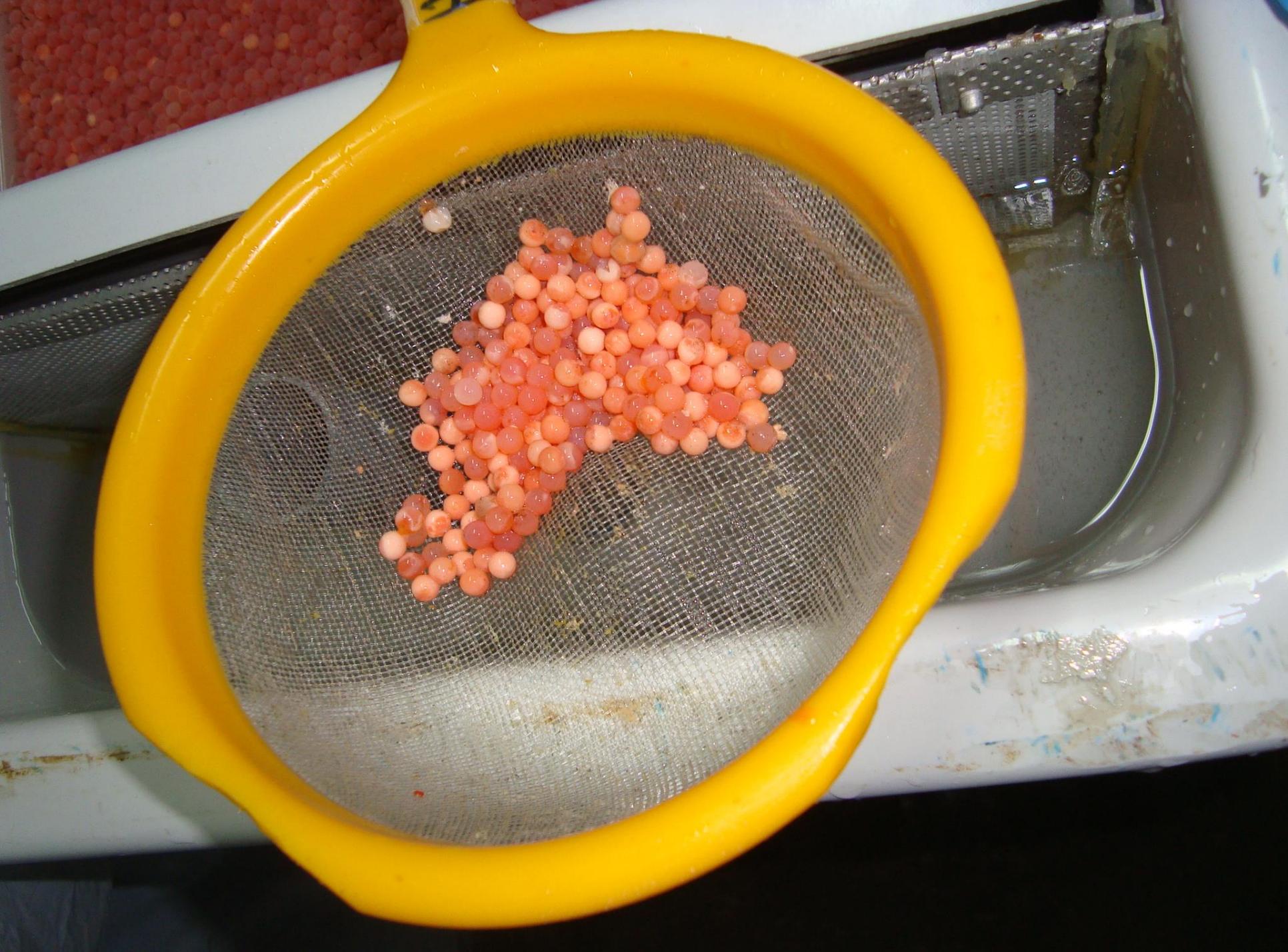
IODINE  
IODINE  
IODINE

2  
3700  
BASE 1  
BASE 2  
BASE 3  
BASE 4  
BASE 5  
BASE 6  
BASE 7  
BASE 8  
BASE 9  
BASE 10  
BASE 11  
BASE 12  
BASE 13  
BASE 14  
BASE 15  
BASE 16  
BASE 17  
BASE 18  
BASE 19  
BASE 20  
BASE 21  
BASE 22  
BASE 23  
BASE 24  
BASE 25  
BASE 26  
BASE 27  
BASE 28  
BASE 29  
BASE 30  
BASE 31  
BASE 32  
BASE 33  
BASE 34  
BASE 35  
BASE 36  
BASE 37  
BASE 38  
BASE 39  
BASE 40  
BASE 41  
BASE 42  
BASE 43  
BASE 44  
BASE 45  
BASE 46  
BASE 47  
BASE 48  
BASE 49  
BASE 50  
BASE 51  
BASE 52  
BASE 53  
BASE 54  
BASE 55  
BASE 56  
BASE 57  
BASE 58  
BASE 59  
BASE 60  
BASE 61  
BASE 62  
BASE 63  
BASE 64  
BASE 65  
BASE 66  
BASE 67  
BASE 68  
BASE 69  
BASE 70  
BASE 71  
BASE 72  
BASE 73  
BASE 74  
BASE 75  
BASE 76  
BASE 77  
BASE 78  
BASE 79  
BASE 80  
BASE 81  
BASE 82  
BASE 83  
BASE 84  
BASE 85  
BASE 86  
BASE 87  
BASE 88  
BASE 89  
BASE 90  
BASE 91  
BASE 92  
BASE 93  
BASE 94  
BASE 95  
BASE 96  
BASE 97  
BASE 98  
BASE 99  
BASE 100

BASE 5  
BASE 6  
BASE 7  
BASE 8  
BASE 9  
BASE 10  
BASE 11  
BASE 12  
BASE 13  
BASE 14  
BASE 15  
BASE 16  
BASE 17  
BASE 18  
BASE 19  
BASE 20  
BASE 21  
BASE 22  
BASE 23  
BASE 24  
BASE 25  
BASE 26  
BASE 27  
BASE 28  
BASE 29  
BASE 30  
BASE 31  
BASE 32  
BASE 33  
BASE 34  
BASE 35  
BASE 36  
BASE 37  
BASE 38  
BASE 39  
BASE 40  
BASE 41  
BASE 42  
BASE 43  
BASE 44  
BASE 45  
BASE 46  
BASE 47  
BASE 48  
BASE 49  
BASE 50  
BASE 51  
BASE 52  
BASE 53  
BASE 54  
BASE 55  
BASE 56  
BASE 57  
BASE 58  
BASE 59  
BASE 60  
BASE 61  
BASE 62  
BASE 63  
BASE 64  
BASE 65  
BASE 66  
BASE 67  
BASE 68  
BASE 69  
BASE 70  
BASE 71  
BASE 72  
BASE 73  
BASE 74  
BASE 75  
BASE 76  
BASE 77  
BASE 78  
BASE 79  
BASE 80  
BASE 81  
BASE 82  
BASE 83  
BASE 84  
BASE 85  
BASE 86  
BASE 87  
BASE 88  
BASE 89  
BASE 90  
BASE 91  
BASE 92  
BASE 93  
BASE 94  
BASE 95  
BASE 96  
BASE 97  
BASE 98  
BASE 99  
BASE 100

BASE 1  
BASE 2  
BASE 3  
BASE 4  
BASE 5  
BASE 6  
BASE 7  
BASE 8  
BASE 9  
BASE 10  
BASE 11  
BASE 12  
BASE 13  
BASE 14  
BASE 15  
BASE 16  
BASE 17  
BASE 18  
BASE 19  
BASE 20  
BASE 21  
BASE 22  
BASE 23  
BASE 24  
BASE 25  
BASE 26  
BASE 27  
BASE 28  
BASE 29  
BASE 30  
BASE 31  
BASE 32  
BASE 33  
BASE 34  
BASE 35  
BASE 36  
BASE 37  
BASE 38  
BASE 39  
BASE 40  
BASE 41  
BASE 42  
BASE 43  
BASE 44  
BASE 45  
BASE 46  
BASE 47  
BASE 48  
BASE 49  
BASE 50  
BASE 51  
BASE 52  
BASE 53  
BASE 54  
BASE 55  
BASE 56  
BASE 57  
BASE 58  
BASE 59  
BASE 60  
BASE 61  
BASE 62  
BASE 63  
BASE 64  
BASE 65  
BASE 66  
BASE 67  
BASE 68  
BASE 69  
BASE 70  
BASE 71  
BASE 72  
BASE 73  
BASE 74  
BASE 75  
BASE 76  
BASE 77  
BASE 78  
BASE 79  
BASE 80  
BASE 81  
BASE 82  
BASE 83  
BASE 84  
BASE 85  
BASE 86  
BASE 87  
BASE 88  
BASE 89  
BASE 90  
BASE 91  
BASE 92  
BASE 93  
BASE 94  
BASE 95  
BASE 96  
BASE 97  
BASE 98  
BASE 99  
BASE 100









Genetic Fish Rise

OBRIGADO



Dr. Darci Carlos Fornari  
Genetic Fish Rise

[darcifornari@geneticfish.com.br](mailto:darcifornari@geneticfish.com.br)

[www.geneticfish.com.br](http://www.geneticfish.com.br)