

Resumo

Actualmente, a criopreservação de embriões de peixes é um objectivo de grande relevância para as empresas de aquacultura, mas até à data não existem resultados positivos, apesar dos esforços desenvolvidos por vários grupos situados em diferentes países. Uma das principais razões para este acontecimento é a elevada sensibilidade dos embriões à refrigeração, realçando a necessidade de testar diferentes métodos e agentes crioprotectores (CPAs) alternativos, de forma a melhorar a possibilidade de alcançar este fim. Neste trabalho, usou-se a proteína anticongelante tipo I (AFP I) como crioprotector natural. Esta proteína é naturalmente expressa nas espécies de peixes do Ártico, inibindo o crescimento dos cristais de gelo e a recristalização durante o descongelamento. Embriões de *Sparus aurata* (dourada) foram microinjectados com AFP I em estádios de desenvolvimento diferentes, 2 células e blástula, na interface blastoderme-vitelo e saco vitelino, respectivamente. Embriões controlo, apenas manipulados (picados pela microagulha, mas sem microinjecção) e microinjectados foram submetidos a refrigeração a duas temperaturas diferentes, 0 °C (1h) e -10 °C (15min) a partir do estádio de 17 somitos. Estes embriões foram submetidos a -10 °C em 3M DMSO de forma a evitar a formação de cristais de gelo na solução extracelular. A sobrevivência após refrigeração foi estabelecida como sendo a percentagem de embriões eclodidos. Para estudar a distribuição da AFP I nos embriões microinjectados realizou-se um estudo por microscopia confocal. Os resultados demonstraram que AFP I pode incrementar significativamente a resistência ao frio a 0 °C, particularmente nos embriões microinjectados em 2 células, apresentando taxas de eclosão próximas de 100%. Este facto encontra-se de acordo com as imagens de microscopia confocal, as quais confirmam a presença da proteína nas células embrionárias e suportam a hipótese de que esta proteína protege as estruturas celulares através da estabilização das membranas. A criopreservação de blastómeros é uma alternativa fiável à criopreservação de embriões. Neste estudo, blastómeros de peixe zebra em 50% epibolia foram submetidos a diferentes tratamentos: (1) PBS 30min TA; (2) 2M DMSO 30min TA e (3) 10mg/ml AFP I em 2M DMSO. A toxicidade dos CPAs e viabilidade celular foi analisada após a criopreservação. A presença de AFP I na solução crioprotectora incrementou significativamente a sobrevivência celular após a vitrificação. A electroporação das células na presença dos CPAs, incluindo AFP I, não conduziu a nenhum melhoramento na sobrevivência celular após vitrificação, tendo um impacto negativo em alguns dos casos estudados. Este estudo demonstra que o uso da proteína AFP

I é vantajoso na criopreservação de blastómeros de peixes, incrementando a resistência ao frio para determinadas temperaturas.

Palavras-chave: embriões dourada; blastómeros peixe-zebra; AFP I; CPAs; microinjecção, electroporação, resistência ao frio; criopreservação, *Sparus aurata*, *Danio rerio*.

Abstract

To date, all attempts at fish embryo cryopreservation have failed. One of the main reasons for this to occur is the high chilling sensitivity reported in fish embryos thus emphasizing the need for further testing of different methods and alternative cryoprotective agents (CPAs) in order to improve our chances of success. In this work we have used the antifreeze protein type I (AFP I) as a natural CPA. This protein is naturally expressed in sub-arctic fish species, and inhibits the growth of ice crystals as well as recrystallization during thawing. Embryos from *Sparus aurata* were microinjected with AFP I at different developmental stages, 2 cells and blastula, into the blastomere-yolk interface and into the yolk sac respectively. Control, punctured and microinjected embryos were subjected to chilling at two different temperatures, 0 °C (1h) and -10 °C (15min) when embryos reached 17 somite stage. Embryos were subjected to -10°C chilling in a 3M DMSO extender to avoid ice crystal formation in the external solution. Survival after chilling was established as the percentage of embryos that hatch. To study the AFP I distribution in the microinjected embryos, a confocal microscopy study was done. Results demonstrate that AFP I can significantly improve chilling resistance at 0°C, particularly in 2-cell microinjected embryos, displaying nearly 100% hatching rates. This fact is in agreement with the confocal microscopy observations which confirmed the presence of the AFP protein in embryonic cells. These results support the hypothesis that AFP protects cellular structures by stabilizing cellular membranes. Blastomere cryopreservation is a feasible alternative to embryo cryopreservation, In this study, zebrafish blastomeres at 50% epiboly were subjected to different treatments: (1) PBS 30min RT, (2) 2M DMSO 30min RT;(3) 2M DMSO+AFP I (10mg/ml). Cryoprotectant toxicity and cell viability after cryopreservation in those solutions were analyzed. The presence of AFP type I in the cryoprotectant solution significantly improves cell survival after vitrification. Cell electroporation in the presence of cryoprotectants, including AFP I, did not report any improvement in cell survival after vitrification having a negative impact in some of the studied cases. This study demonstrate that the use of AFP type I is advantageous in the cryopreservation of fish blastomeres and improve fish embryo resistance to chilling at certain temperatures.

Key-words: seabream embryos; zebrafish blastomeres; AFP I; CPAs; microinjection; electroporation; chilling resistance; cryopreservation, *Sparus aurata*, *Danio rerio*.