



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS - REGIONAL JATAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

OLIVIA BASSO ROCHA

**CRIOPROTETORES E EMBRIOTOXICIDADE EM
ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Jataí – GO

2018

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Adriana Barros Rocha

Título do trabalho: Empreendedorismo e sustentabilidade em pequenas empresas (Dissertação)

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Adriana Barros Rocha
Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:

Richard
Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 14 / 12 / 2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

Versão atualizada em setembro de 2017.

OLIVIA BASSO ROCHA

CRIOPROTETORES E EMBRIOTOXICIDADE EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Orientador (a): Dra. Mônica Ferreira Machado

**Dissertação apresentada ao
Programa de Biociência Animal da
Universidade Federal de Goiás,
Regional Jataí, como pré-requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre em Biociência Animal.**

JATAÍ – GO

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Basso, Olívia

CRIOPROTETORES E EMBRIOTOXICIDADE EM ZEBRAFISH
(Danio rerio) [manuscrito] / Olívia Basso, Monica Machado. - 2018.
XIV, 79 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Monica Machado.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade
Acadêmica Especial de Biociência, Programa de Pós-Graduação em
Biociência Animal, Jataí, 2018.

Bibliografia. Anexos.

Inclui gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. GLICEROL. 2. METANOL. 3. ETILENOGLICOL. 4.
CRIOPRESERVAÇÃO. I. Machado, Monica. II. Machado, Monica,
orient. III. Título.

CDU 57



Universidade Federal de Goiás
Regional Jataí
Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal

Ata de Defesa Pública de Dissertação de Mestrado

Ao trigésimo primeiro dia do mês de outubro de 2018, às 08:00 horas, no Prédio da Pós-Graduação da Regional Jataí da Universidade Federal de Goiás, iniciaram-se os trabalhos referentes à Defesa Pública de Dissertação de Mestrado da candidata **OLIVIA BASSO ROCHA**, com o trabalho intitulado **"CRIOPROTETORES E EMBRIOTOXIDADE EM ZEBRAFISH (DANIO RERIO)"**. A Banca Examinadora, constituída pelos(as) membros: Prof. Dr.ª Mônica Rodrigues Ferreira Machado (Orientadora/Presidente), Prof. Dr. Gustavo Henrique Marques Araújo (Membro Interno), Prof. Dr. Luis David Solis Murgas (Membro Externo), considerou a candidata Olivia Basso Rocha: **APROVADA (x) REPROVADA ()**. Foi concedido um prazo de ___ dias, para o candidato efetuar as correções sugeridas pela Banca Examinadora e entregar o trabalho em sua redação definitiva. E, para constar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca.



Prof. Dr.ª Mônica Rodrigues Ferreira Machado
Orientadora/Presidente



Prof. Dr. Gustavo Henrique Marques Araújo
Membro Interno



Prof. Dr. Luis David Solis Murgas
Membro Externo

Agradecimentos

Á professora e orientadora Dra. Mônica Machado, tanto por compartilhar seu conhecimento e experiência, como pelo financiamento do trabalho.

Aos meus parceiros de laboratório Michele Rezende, Silênio Reis e Lucimíria Rabelo, por dividir todo o cansaço e momentos difíceis do trabalho, e por torna-los mais agradáveis.

Ao laboratório LABFISH, por todo suporte, equipamentos e materiais.

Aos meus companheiros de laboratório, muito obrigada pela compreensão, ajuda e companheirismo.

Aos meus familiares, por acreditarem e investirem de todas as maneiras possíveis no meu futuro.

Ao meu namorado Flávio, por passar comigo todos os momentos difíceis, me convencendo sempre que tudo acabaria da melhor maneira possível.

Aos todos meus docentes, que me indicaram por todo caminho, a melhor maneira de ser ético e gostar da profissão, e por todo ensinamento.

Á técnica de laboratório Lilia Cristina, pela prontidão em sempre ajudar quando necessário.

Á CAPES.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

A criopreservação é uma técnica que resulta na inércia do desenvolvimento embrionário e consiste na desidratação do embrião, seguido de resfriamento com crioprotetores, a fim de manter intacto o material genético da célula desejada. A criopreservação em peixes ainda não é uma técnica viável, por vários motivos, entre eles podem ser citados: tamanho do embrião e a citotoxicidade dos crioprotetores. Todos os testes realizados para toxicidade crioprotetora estão relacionados à manutenção dos embriões em diferentes concentrações à temperatura ambiente. No entanto, não há dados comparando esta toxicidade entre os embriões mantidos à temperatura ambiente. Assim, o objetivo do presente trabalho foi analisar a toxicidade de crioprotetores em temperatura ambiente e resfriados. Os testes foram realizados em embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*) usando 12 concentrações dos compostos, em diluição seriada, de 50% a 0,002%. Observações de mortalidade e alterações teratogênicas foram feitas a cada 24 horas. O DMSO e o glicerol são os menos tóxicos, mas determinam a formação de edema de pericárdio, quando usados em concentrações maiores que 3,12%. À temperatura de resfriamento, observamos que a toxicidade dos crioprotetores diminuiu e que houve um aumento no atraso na eclosão, o que era esperado, já que em baixas temperaturas o tempo de desenvolvimento do embrião foi reduzido. Os crioprotetores mais indicados para o resfriamento foram o metanol e o etilenoglicol, em concentrações de 1,56% a 0,78%.

Palavras chaves: glicerol, metanol, etilenoglicol, glicerol, criopreservação

ABSTRACT

Cryopreservation is a technique that develops in dependence on embryonic development and in a process compression, followed by cryoprotective cooling, in order to keep intact the genetic material of the desired cell. Cryopreservation in fish is not yet viable citadella, for several reasons, among them can be cited: embryo size and cryoprotectant cytotoxicity. All tests performed for cryoprotectant toxicity were related to the maintenance of the embryos in different reactions at room temperature. However, there is no data comparing toxicity between temperature increases. Thus, the present work was analyzed on the toxicity of cryoprotectants at room temperature and colds. The testes were separated in zebrafish embryos (*Danio rerio*) using 12% of the compounds, in serial dilution, of 50% to 0.002%. Observations of deaths and teratogenic changes were made every 24 hours. DMSO and glycerol are the least toxic, but they determine the formation of perimeter edema, when they are used in a greater number of children than 3.12%. At the temperature of cooling, we observed that the toxicity of cryoprotectants decreased and that there was an increase in hatch delay, which was expected, since the low temperatures the embryo development time were reduced. The cryoprotectants were most suitable for cooling were methanol and ethylene glycol, in concentrations of 1.56% to 0.78%.

Key – words: glycerol; methanol; ethylenoglycol; cryopreservation

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
1.INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES.....	4
3.2 CRIOPROTETORES	5
3.3 CRIOPRESERVAÇÃO EM PEIXES	7
3.4 EMBRIOTOXICIDADE	9
4.MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1 COMITÊ DE ÉTICA.....	12
3.2 COLETA DE EMBRIÕES EM ZEBRAFISH	12
4.3 CONCENTRAÇÃO LETAL DE CRIOPROTETORES NA TEMPERATURA AMBIENTE E RESFRIADA.....	13
4.4 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA.....	16
5. RESULTADOS.....	17
5.1 TOXICIDADE DO METANOL EM TEMPERATURA AMBIENTE E RESFRIADA.....	17
4.2 TOXICIDADE DO DMSO EM TEMPERATURA AMBIENTE E RESFRIADA EM EMBRIÕES EXPOSTOS POR 96 HORAS.....	27
5.3 TOXICIDADE DO ETILENOGLICOL EM TEMPERATURA AMBIENTE E RESFRIADA EM EMBRIÕES EXPOSTOS POR 96 HORAS	39
4.4 TOXICIDADE DO GLICEROL EM TEMPERATURA AMBIENTE E RESFRIADA EM EMBRIÕES EXPOSTOS POR 96 HORAS	51
5.5 ALTERAÇÕES TERATOGÊNICAS PROVOCADOS POR CRIOPROTETORES	63
6. DISCUSSÃO	67
7. CONCLUSÃO	72
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Valores de p, indicando se existe diferença significativa entre as mortalidades por tempo de exposição a metanol em temperatura ambiente e resfriada.....	23
Quadro 2. Valores de mortalidade (%), p e old ration para cada concentração de metanol após as 96 horas de exposição em temperatura ambiente e resfriada..	24
Quadro 3: Comparação entre a taxa percentual de mortalidade das concentrações de metanol em temperatura ambiente e resfriada e o valor de p.....	25
Quadro 4. Valores de p, indicando se existe diferença significativa entre as mortalidades por tempo de exposição a DMSO em temperatura ambiente e resfriada.....	32
Quadro 5. Valores de mortalidade (%), p e old ration para cada concentração de DMSO após as 96 horas de exposição em temperatura ambiente e resfriada....	33
Quadro 6: Comparação entre a taxa percentual de mortalidade das concentrações de DMSO em diferentes temperaturas e o valor de p.....	34
Quadro 7. Valores de p, indicando se existe diferença significativa entre as mortalidades por tempo de exposição a etilenoglicol em temperatura ambiente e resfriada.....	41
Quadro 8. Valores de mortalidade (%), p e old ration para cada concentração de DMSO após as 96 horas de exposição em temperatura ambiente e resfriada....	42
Quadro 9: Comparação entre a taxa percentual de mortalidade das concentrações de etilenoglicol em diferentes temperaturas e o valor de p.....	43
Quadro 10. Valores de p, indicando se existe diferença significativa entre as mortalidades por tempo de exposição a glicerol em temperatura ambiente e resfriada.....	50

Quadro 11. Valores de mortalidade (%), p e old ration para cada concentração de glicerol após as 96 horas de exposição em temperatura ambiente e resfriada.....	51
Quadro 12: Comparação entre a taxa percentual de mortalidade das concentrações de glicerol em diferentes ambientes e o valor de p.....	50
Quadro 13: Valor de p ao comparar a taxa de teratogênica do grupo controle com o grupo experimental, em temperatura ambiente e resfriada.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem de um embrião e estruturas extraembrionárias de teleósteo evidenciando os principais compartimentos.....	02
Figura 2. Zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	11
Figura 3. Instalações do biotério de zebrafish da Universidade Federal de Goiás – Labfish.....	12
Figura 4. Reprodução montada para coleta de embriões pela manhã. O aquário contém fotoperíodo, oxigenação e termostato. Seleção de embriões.....	13
Figura 5 : Esquema da montagem de placa para teste de concentração letal. Cada cor representa uma concentração, sendo que as últimas fileiras preenchidas em cinza, representam o grupo controle.....	14
Figura 6. Esquema do experimento, onde o grupo teste utiliza diferentes crioprotetores e diferentes concentrações e o controle mantém os embriões em E3.....	15
Figura 7. Concentração letal 50 (CL50) e limite superior e inferior (LS/LI) dos dados da regressão em probit.....	19
Figura 8. Taxa de mortalidade em diferentes fases de desenvolvimento de embriões expostos a metanol em temperatura ambiente e resfriada.....	21
Figura 9. Taxa de mortalidade pelo tempo de exposição ao metanol em temperatura ambiente e resfriada.....	22
Figura 10. Concentração letal 50 (CL50) e limite superior e inferior (LS/LI) dos dados da regressão em probit, indicando a mortalidade acumulada dos embriões nas diferentes concentrações e tempos de exposição testados.....	28
Figura 11. Taxa de mortalidade em diferentes fases de desenvolvimento de embriões expostos a DMSO em temperatura ambiente e resfriada.....	31

Figura 12. Taxa de mortalidade pelo tempo de exposição ao DMSO em temperatura ambiente e resfriada.....	32
Figura 13. Concentração letal 50 (CL50) e limite superior e inferior (LS/LI) dos dados da regressão em probit, indicando a mortalidade acumulada dos embriões nas diferentes concentrações e tempos de exposição testados.....	37
Figura 14. Taxa de mortalidade em diferentes fases de desenvolvimento de embriões expostos a etilenoglicol em temperatura ambiente e resfriada.....	39
Figura 15. Taxa de mortalidade pelo tempo de exposição ao etilenoglicol em temperatura ambiente e resfriada.....	40
Figura 16. Concentração letal 50 (CL50) e limite superior e inferior (LS/LI) dos dados da regressão em probit, indicando a mortalidade acumulada dos embriões nas diferentes concentrações e tempos de exposição testados.....	46
Figura 17. Taxa de mortalidade em diferentes fases de desenvolvimento de embriões expostos a glicerol em temperatura ambiente e resfriada.....	48
Figura 18. Taxa de mortalidade pelo tempo de exposição ao glicerol em temperatura ambiente e resfriada.....	49

1.INTRODUÇÃO

A produção de embriões e o armazenamento dos mesmos em laboratório vem sendo o grande diferencial para a produção de peixes, por facilitar a comercialização dos mesmos e por gerar aumento da produtividade. Estudos relacionados ao armazenamento embrionário por criopreservação vêm surgindo a cerca de cinco décadas, com o primeiro sendo realizado com embriões de camundongos (MASSIP, 2001).

A técnica de criopreservação baseia-se na retirada de água da célula desejada e depois o congelamento da mesma, este processo é utilizado para manutenção e preservação de material genético em diferentes espécies (ZHAO; FU, 2017). Os índices de sobrevivência embrionário de peixes já foram testados para o resfriamento, e eram de aproximadamente 20% em 1988, com o decorrer dos anos estes índices subiram para 80%, até 24 horas após o descongelamento, em mamíferos (BIELANSKI; HARE, 1988; LEIBO; POOL, 2011), porém não se tem nada efetivo para a criopreservação em peixes teleósteos. Ainda se procura novas técnicas também para aumentar a viabilidade dos embriões após o descongelamento, muitas vezes relacionados a toxicidade dos crioprotetores.

Em embriões de peixes os parâmetros criobiológicos apresentam diferenças em relação aos mamíferos, principalmente devido ao tamanho, a compartimentalização, permeabilidade do córion e a presença de estruturas grandes e semipermeáveis, como o saco vitelino (Figura 1) (HAGEDORN et al., 1997). Estas características embrionárias determinam a não realização da criopreservação de embriões em peixes (KUSUDA et al, 2002).

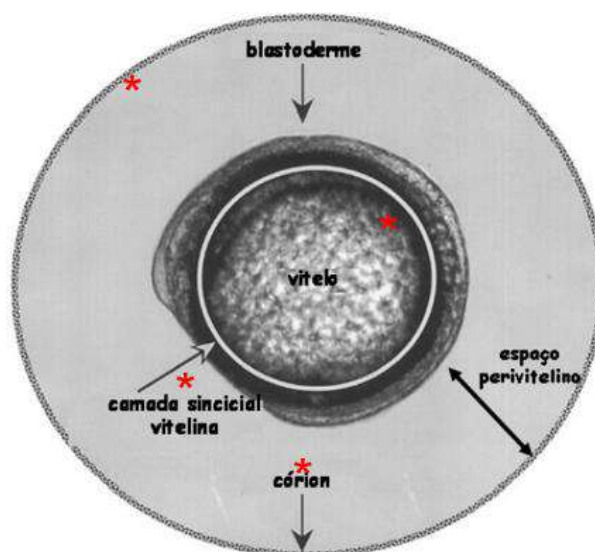


Figura 1. Imagem de um embrião e estruturas extraembrionárias de teleosteo evidenciando os principais compartimentos: córion, espaço perivitelino, blastoderme, camada sincicial vitelina e vitelo. Adaptado de HAGEDORN et al. 1997; PAULA et al. 2014.

Os peixes tropicais comerciais são grandes migradores, com período reprodutivo limitado, chamado piracema e sua carne é bastante apreciada. Para que a reprodução destas espécies ocorra são necessário estímulos como correnteza da água, luminosidade e temperatura. Em cativeiro estes estímulos são escassos, sendo necessário utilização de hormônios para que a desova ocorra (PAULA et al., 2014).

A utilização da técnica de criopreservação tanto de gametas como de embriões seria uma forma de permitir a produção desses peixes ao longo de todo o ano, aumentando assim a lucratividade do mercado. Outro aspecto importante relacionado a criopreservação dos embriões de peixes é a preservação de espécies que estejam ameaçadas de extinção.

Dessa forma o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade de crioprotetores, em temperatura resfriada ou não. Para tanto foram utilizados embriões de *Danio rerio*, conhecidos popularmente como zebrafish. O uso de modelos animais no desenvolvimento de biotecnologias cria ferramentas para que técnicas sejam desenvolvidas. Isso porque a disponibilidade de embriões de

peixes de produção é restrita devido a piracema (SCHNEIDER,2009). O zebrafish é também uma espécie de peixe teleósteo e tropical, possuindo homologia com as espécies de interesse comercial, para as quais é necessário desenvolver a biotécnica para a criopreservação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo foi avaliar o efeito tóxico e letal de crioprotetores em embriões de *Danio rerio* expostos à temperatura ambiente e resfriada.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração letal 50 dos criopreservadores selecionados para embriões de peixes em temperatura ambiente
- Determinar a concentração letal 50 dos criopreservadores selecionados para embriões de peixes em meio resfriado
- Avaliar a taxa de mortalidade / toxicidade dos crioprotetores para os embriões
- Avaliar o efeito do tempo de exposição e correlacionar com a toxicidade dos crioprotetores em temperatura resfriada e ambiente
- Verificar o potencial teratogênico dos compostos em diferentes concentrações e temperaturas para os embriões

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Criopreservação de embriões

A criopreservação de embriões é uma ferramenta muito útil para a embriologia desde do primeiro experimento realizado com sucesso. A técnica é considerada a melhor forma para preservação a longo prazo (ALMIÑANA, CUELLO; 2015). Ela visa facilitar o armazenamento do material genético, garantindo a sua viabilidade pelo maior tempo possível, esse processo se dá através de temperaturas extremamente baixas que levam a quiescência do metabolismo celular até que sua temperatura seja novamente elevada.

O início da técnica de criopreservação com embriões ocorreu em 1971 pelo pesquisador Wittingham e demais colaboradores que realizaram o procedimento em embriões de camundongos e verificaram a viabilidade de transferência dos mesmos, a técnica então foi somente utilizada em bovinos em 1973, onde os primeiros relatos são referenciados. Esta técnica é essencial para reprodução assistida desenvolvida hoje na produção animal (MASSIP, 2001; WAKCHAURE et al., 2016).

A técnica baseia-se na remoção total ou parcial de água das células, sendo estas submetidas a períodos de temperatura a baixo de zero para o congelamento, para que não ocorra a formação de cristais de gelo e que a desidratação não leve a danos celulares. Para tanto são utilizados compostos denominados crioprotetores, que são capazes de retirar água do interior dessas células por diferença de osmolaridade (ARGYLE et al, 2016; ZHAO; FU, 2017).

Duas técnicas de criopreservação são as mais utilizadas até o momento, a de congelamento lento, também conhecida como congelamento convencional e a vitrificação. O congelamento lento é o método mais tradicional e requer uma redução controlada de temperatura antes do contato direto com o nitrogênio líquido. Na vitrificação a amostra pode ser adicionada ao nitrogênio líquido

rapidamente usando soluções crioprotetoras concentradas. Para que a criopreservação ocorra, as amostras devem então ser mantidas a temperatura de cerca de -130°C , temperatura semelhante à do nitrogênio líquido (AL-AZAWI et al., 2013; DODE et al. 2013; MANDAWALA et al., 2016).

Autores descrevem alguns princípios básicos para a vitrificação, como a relação entre massa e volume da amostra, ou seja, fato da velocidade do resfriamento estar relacionada a massa térmica da amostra e sua área de superfície, dessa forma como o embrião de peixe tem um tamanho maior em relação aos mamíferos, seu tempo de resfriamento seria maior (ARAV, 2014).

A vitrificação vem ganhando espaço por ser um método mais barato, rápido e por apresentar melhor resultado de viabilidade das células após o congelamento assim alguns pesquisadores acreditam que esta seja a alternativa para se alcançar sucesso com a criopreservação de embriões muito sensíveis à redução da temperatura (MANDAWALA et al., 2016).

3.2 Crioprotetores

As soluções crioprotetoras são solutos orgânicos que protegem as organelas celulares durante o congelamento (HERRID et al., 2017). Os crioprotetores penetram e desidratam as células, minimizando alterações celulares e danos na membrana ocasionados pela formação dos cristais de gelo. No entanto a baixa toxicidade e a alta solubilidade na água são requisitos essenciais para um agente químico ser considerado como crioprotetor (CHAO, 2001).

Os crioprotetores são diferenciados pela sua atividade intra- e extracelular, aqueles com ação intracelular são representados principalmente pelo glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) e etilenoglicol. Como substâncias não permeáveis à célula pode-se citar as proteínas (albumina sérica bovina), os açúcares (sacarose, lactose e trealose, entre outros). Os crioprotetores de ação intracelular são moléculas pequenas capazes de penetrar a membrana plasmática e agem formando pontes de hidrogênio com moléculas de água

presentes no interior da célula, isso ocorre devido as propriedades ligantes e coligativas que estes possuem, alguns exemplos desses tipos de substâncias são dimetilsulfóxido (DMSO) e o glicerol (JANG et al., 2017; WAKCHAURE et al., 2016).

O DMSO é um líquido orgânico, incolor, oleoso e sem odor, cuja fórmula é C_6H_6SO (ROSENBAEM, 1965), derivado da lignina, e teve sua primeira utilização na preservação de órgãos (JACOB, 1983). Esse crioprotetor é um dos mais utilizados para preservar células espermáticas de peixe de água doce. Em algumas espécies a toxicidade do DMSO pode ser suprimida pela adição de carboidratos (LEUNG, 1991).

Este solvente é muito utilizado para testes com embriões de peixes, uma vez que agrega algumas vantagens em relação aos demais crioprotetores, como uma menor toxicidade e a capacidade de penetrar membranas biológicas sem acarretar danos significativos (KAIS et al., 2013). A permeabilidade do DMSO ao corion do zebrafish é menor nas primeiras 24 horas pós fertilização, enzimas proteolíticas após 24 horas, promovem “suavização de córion, aumentando a permeabilidade e assim a toxicidade “(KAIS et al., 2013; KIM et al., 2004). Esta substância pode induzir diferenciação em várias células, levando a alterações teratogênicas (ADLER et al., 2013).

CABRITA et al. (2003) mostrou que o DMSO seria altamente penetrante, dessa forma sendo usado em embriões de peixes devido suas células mais complexas.

O etilenoglicol, é proveniente do metanol (CH_3OH) e do óxido de eteno (CH_2OCH_2), sendo utilizado como crioprotetor na preservação de embriões bovinos (TAKAGI et al., 1993) e tem sido usado na criopreservação de algumas espécies de peixes (Viveiros et al., 2009). Dentre suas características, está o seu peso molecular baixo, que facilita a permeação com um menor período de exposição (CORTÊS et al., 2000).

O metanol atravessa a membrana de maneira mais rápida do que os outros crioprotetores, porém é considerado o mais tóxico para a maioria das espécies de peixes, o etilenoglicol é um dos crioprotetores internos que têm sido

aplicado em peixes e mostra resultados satisfatórios no congelamento de sêmen. Em testes com embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), o metanol, principalmente quando adicionada a soluções de sacarose, mostraram maiores taxas de eclosão em relação ao etilenoglicol (STREIT JUNIOR et.al; 2007). Em testes com embriões de cascudo preto (*Rhinelepis áspera*) o metanol mostrou se menos tóxico em baixas temperaturas em comparação com etilenoglicol e DMSO (FORNARI et al.,2014).

Estudo realizados por CHEN (2005) na tentativa de criopreservação de embriões de linguado, demonstraram que o metanol seria o crioprotetor mais toxico, seguido de DMSO, etilenoglicol e por último e menos tóxico o glicerol. Também foi encontrada que embriões em estágios iniciais com formação de somitos foram mais tolerantes do que embriões em estágios de gástrula e fechamento de blastóporo.

O glicerol, ou 1,2,3-propanotriol ($C_3H_8O_3$) ocorre em formas combinadas, como com ácidos graxos nos triglicerídeos, em todos os óleos graxos animais e vegetais (VIEIRA et al., 2011). O glicerol é um líquido oleoso, incolor, viscoso e de sabor doce, solúvel em água e álcool. Esse crioprotetor causa alterações na polimerização da tubulina, na associação de microtúbulos e no balanço bioenergético (HAMMERSTED; GRAHAM,1992).

ZHANG et al. (2012) testando seis crioprotetores diferentes, entre eles, etilenoglicol (EG), DMSO, Glicerol (GI) e metanol (MEOH), encontrou a seguinte relação entre a comparação do grau de toxicidade das soluções $MeOH = DMSO < GI < EG$.

3.3 Criopreservação em peixes

Quando se diz respeito a criopreservação de embriões de peixes um dos desafios é a baixa capacidade de penetração do crioprotetor. Sendo que esta capacidade representa um passo importante para a remoção osmótica da água durante o processo de resfriamento, explicando a baixa efetividade da utilização das técnicas tradicionais (HAGEDORN et al., 2004).

Alguns outros fatores têm contribuído para relativo insucesso da criopreservação em teleósteos: o amplo tamanho do ovo o que poderia retardar o fluxo/influxo da água e do crioprotetor; o grande volume de células como o vitelo, o que poderia elevar a probabilidade de rompimento da membrana pela formação de gelo intracelular; a compartimentalização existente entre a blastoderme e o vitelo; a presença de membranas semi-permeáveis ao redor do embrião e a potencial susceptibilidade do embrião a danos pelo resfriamento (HAGEDORN et al., 1997; ARAÚJO et al., 2016).

Vários estudos vêm sendo realizados para tentar solucionar os problemas, como análises de toxicidade dos crioprotetores, curvas de resfriamentos, diminuição de crioinjúrias e testes em diferentes estágios embriológicos.

Estudos realizados com embriões de zebrafish (*Danio rerio*) mostraram o efeito das curvas de resfriamento lento (10°C/minuto), intermediário (30°C/minuto) e rápido (~300°C/minuto), utilizando-se como crioprotetor o metanol, em diferentes estádios embrionários. Os autores verificaram que o efeito do metanol foi mais pronunciado quando os embriões foram submetidos ao resfriamento lento (ZHANG et al., 2003).

Quando o resfriamento é suficientemente lento, as células são capazes de perder água rapidamente por osmose, suportando a desidratação e mantendo o equilíbrio do potencial químico da água e da solução intracelular com a água extracelular (MERYMAN, 1977). Porém, este mesmo autor mostra que a exposição das células a solução crioprotetora leva a um estresse osmótico, que dependendo da concentração, duração e temperatura de exposição à solução, pode levar a célula ao colapso. Por outro lado, se o resfriamento for rápido, o potencial químico da água e da solução extracelular diminui mais rápido do que o da água intracelular, resultando em água intracelular remanescente que eventualmente, forma gelo na célula e que muitas vezes é letal (ZHANG et al., 2007). A formação do cristal de gelo é uma das razões para a falha do processo de criopreservação, por isso o entendimento deste processo é crucial para o desenvolvimento de uma boa metodologia para esta técnica (LI et al., 2009).

Devemos levar em consideração a expressão gênica que pode estar relacionada com a manutenção da integridade embrionária durante e após o

procedimento, a criopreservação pode alterar a expressão de genes housekeeping, que promovem a homeostasia do desenvolvimento embrionário, estabilizando e mantendo o desenvolvimento normal (BOONKUSOL et al., 2006).

A relação existente entre a sensibilidade do embrião ao frio e o estágio de desenvolvimento embrionário em peixes foi verificado para diferentes espécies inclusive para *Danio rerio* (HAGEDORN et al., 1997; ZHANG; RAWSON, 1995). A maioria desses estudos revelou que os embriões em estádios iniciais do desenvolvimento são mais sensíveis às injúrias causadas pelo frio. O estágio embrionário também está relacionado à permeabilidade da membrana em peixes, durante o desenvolvimento as células embrionárias sofrem uma redução devido ao processo de clivagem, assim ocorre o aumento do volume em relação à superfície gerando uma maior permeabilidade (CALVI; MAISSE, 1998).

Avaliações realizadas sobre a permeabilidade de DMSO encontraram que no início do desenvolvimento embrionário é necessária uma maior concentração de crioprotetor do que em embriões com 48 horas pós fertilização. No mesmo estudo os embriões passaram por processo de vitrificação e após o degelo 15% sobreviveram por cerca de alguns dias, porém nenhum sobreviveu até a eclosão (ROBLES et al., 2005).

3.4 Embriotoxicidade

Diferentes estágios embrionários de peixes estão sendo usados como modelos para pesquisas, uma vez que de acordo com os 3Rs (substituição, redução e refinamento das técnicas). Os embriões são substitutos para o uso de animais, como camundongos, uma vez que em estágios de desenvolvimento tendem a sofrer menos ou nenhuma dor e sofrimento duradouro (STRAHLE et al., 2012).

A técnica de testes de toxicidade utilizando embriões de peixes surgiu a cerca de uma década como ferramenta para avaliar a toxicidade aguda de substâncias. Inicialmente o teste era aplicado em embriões fecundados por cerca de 48 horas, sendo a letalidade indicada pela coagulação do embrião, falta

de somitos ou falta de batimentos cardíacos (BELANGER et al. 2013). Em 2013, os testes de toxicidade aguda em embriões de peixes foram aprovados pelo Grupo de Trabalho dos Coordenadores Nacionais (WNT) do Programa de Orientação de Testes da OCDE e publicado como diretriz de teste da OCDE (TG) no. 236 em 26 de julho de 2013 (OECD 2013). Oficialmente, a diretriz de teste pretende determinar a toxicidade aguda ou letal de produtos químicos em embriões de peixe (*Danio rerio*) (BRANBECK et al, 2014).

Segundo as normas das diretrizes da OECD (2013), os embriões devem ser expostos aos produtos químicos em testes de 96 horas. Sendo que a cada 24 horas devem ser avaliadas as: letalidade, ausência de batimento cardíaco, ausência de sômitos, não descolamento de cauda e alterações teratogênicas. A exposição deve-se iniciar no máximo até 1,5 horas após a fertilização e ao final é calculada a LC50 (concentração letal 50) (Knöbel et al. 2012).

O Zebrafish (*Danio rerio*) é um peixe teleósteo pertencente à família Cyprinidae de água doce e tropical. Trata-se de um peixe pequeno medindo entre 3 a 4 centímetros de comprimento. (SCHNEIDER et al., 2009). Sua popularidade laboratorial vem aumentando nas últimas décadas, isso se deve provavelmente as características embrionárias e sua rotina laboratorial bem descrita (LAWRENCE, 2007). Este animal também vêm sendo muito utilizado como modelo para estudos relacionados a patologias e toxicologia em humanos, isso porque se demonstrou que existe cerca de 70 % de semelhança genética entre o genoma humano com o desta espécie).

Os indivíduos dessa espécie apresentam dimorfismo sexual entre machos e fêmeas. Por exemplo os machos apresentam sua região ventral mais afilada, enquanto nas fêmeas tal região encontra-se mais arredondada (Figura 2). O zebrafish é um animal que apresenta sua fecundação e desenvolvimento externos, sendo classificados como ovíparos e em condições favoráveis cada fêmea chega desova em intervalos de 2-3 dias (LAWRENCE, 2007).

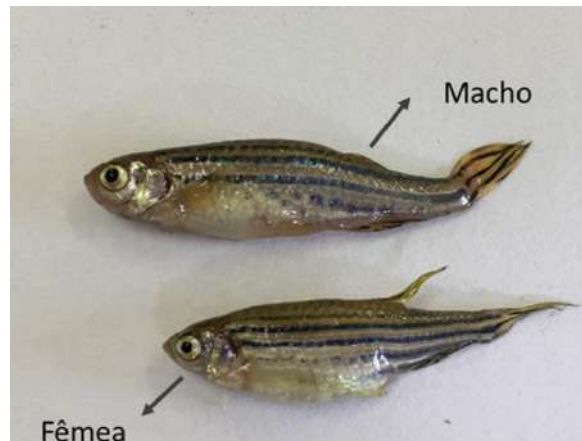


Figura 2. Zebrafish (*Danio rerio*).

A utilização do zebrafish como modelo experimental, principalmente em testes embriogênicos, vem crescendo exponencialmente. A transparência dos embriões permite o monitoramento da capacidade teratogênica dos compostos além do acompanhamento de todo o desenvolvimento embrionário até o momento da eclosão. Outras características que atraem os pesquisadores para o uso do zebrafish são, o seu ciclo curto de reprodução e a transparência dos seus embriões durante o desenvolvimento, permitindo assim realizar análises de morfológicas e de formação de estruturas e órgãos (BEEKHUIJZEN et al, 2015; HOO et al, 2016).

Suas principais fases de criopreservação são blástula, gástrula e fechamento de blastóporo, que ocorrem antes das primeiras 24 hpf. Após a fertilização o embrião sofre o primeiro evento de divisão mitótica em 40 minutos, no período de 2 hpf ocorre a fase de blástula, onde há formação do blastoderme, sendo formado por espaços irregulares entre as células. No período 5 hpf é a fase de gastrulação, onde as clivagens continuam, porém em uma velocidade menor, ocorre a formação do eixo embrionário. O fechamento de blastóporo corresponde a 100% de epibolia (KIMMEL et al., 1995).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Comitê de ética

O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da UFG (CEUA/UFG), para ser executado, onde foi aprovado com o número de protocolo 001/18 (Anexo 1).

3.2 Coleta de embriões em zebrafish

Para realização da pesquisa foram utilizados 80 reprodutores; sendo 60 machos e 20 fêmeas. Os peixes foram mantidos em laboratório de acordo com o descrito no livro do zebrafish (WESTERFIELD, 2000). Os mesmos foram situados em aquários de polietileno, no Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de peixes do Instituto de Biociências, da Universidade Federal de Goiás – Regional Jataí (Figura 3). Os aquários foram mantidos em sistema de recirculação de água, com temperatura controlada em média de 28,5°C, em fotoperíodo de 14 horas luz por 10 horas escuro. Os mesmos foram alimentados cinco vezes ao dia, com ração comercial, microvermes e arthermias, sendo a terceira alimentação do dia com alimento vivo.



Figura 3. Instalações do biotério de zebrafish da Universidade Federal de Goiás - Labfish

Para a reprodução foram selecionadas fêmeas com ventre abaulado e machos com coloração amarelada forte nas nadadeiras peitorais (Figura 3). Os

reprodutores foram remanejados dos aquários, para criadeiras com as mesmas dimensões dos aquários de manutenção, tamanho de 11,5 cm x 34,5 cm x 15,5 cm, com capacidade para 15 peixes; em uma proporção de 2 machos para 1 fêmea. Em 24 horas após a seleção, os machos e as fêmeas eram alocados juntos, e após os embriões oriundos da reprodução foram coletados e transferidos para placas de petri, para sua seleção em bons (células compactadas, coloração normal), intermediários (poucas células soltas), ruins (várias células soltas, coloração escura, desenvolvimento anormal) e não fecundados (Figura 4).

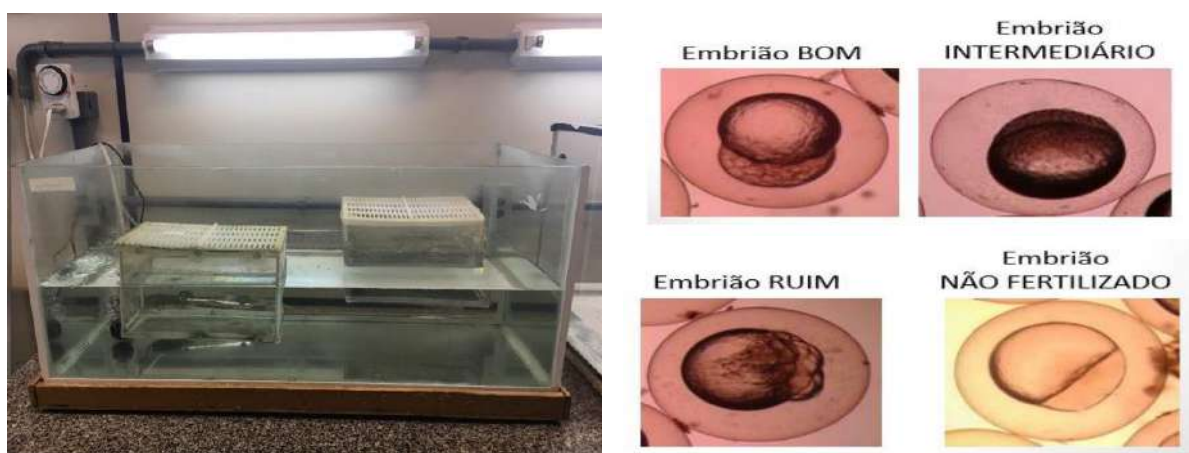


Figura 4. Reprodução montada para coleta de embriões pela manhã. O aquário contém fotoperíodo, oxigenação e termostato. Seleção de embriões.

4.3 Concentração letal de crioprotetores na temperatura ambiente e resfriada

Em uma placa de 96 pocos foram utilizados 1 embrião/poco, contendo 200µl de E3 associado ou não ao crioprotetor. A placa de 96 poços no sentido horizontal possuía 12 poços por fileira, (1 – 12) e no sentido vertical, 8 poços, (A – H). Na fileira (A) foram alocados os embriões 4 células, em maior concentração de crioprotetor (50%). A partir da primeira concentração utilizada foram adicionados 100 uL de E3 (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.4 mM CaCl₂, 0.16 mM MgSO₄), em diluição seriada, sendo as concentrações testadas: 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,12 %, 1,56 %, 0,78 %, 0,39 %, 0,19 %, 0,09 %, 0,04 %, 0,02 %. Os crioprotetores selecionados foram: metanol, DMSO (dimetilsulfóxido), etilenoglicol e glicerol. Em todos os experimentos um controle foi mantido com

vinte e quatro embriões apenas em E3 (Figura 5). Para cada fase foram realizadas quatro placas, com cinco repetições. Sendo que foram utilizados então oitenta e quatro embriões por placa, em um total de 1344 embriões por crioprotetor (Figura 6).

A avaliação da concentração letal de crioprotetores, foi realizada durante 96 horas, seguindo as normas da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, OECD (1992). Os embriões foram avaliados nas fases: 30% de epibolia (blástula), 50% epibolia (gástrula), fechamento de blastóporo, 24 horas pós fertilização (hpf), 48 hpf, 72 hpf e 96 hpf. Durante as avaliações os embriões foram caracterizados como vivo, morto ou apresentando alteração teratogênica.

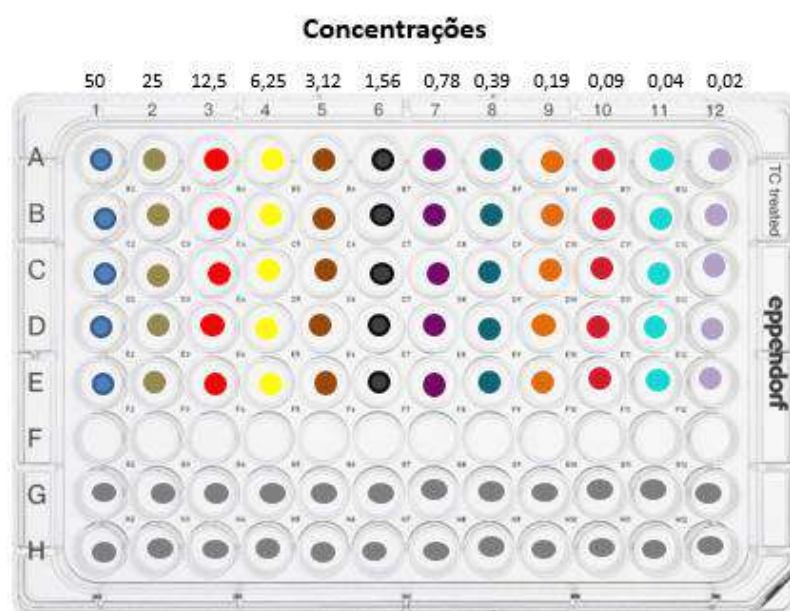


Figura 5 : Esquema da montagem de placa para teste de concentração letal. Cada cor representa uma concentração, sendo que as últimas fileiras preenchidas em cinza, representam o grupo controle.

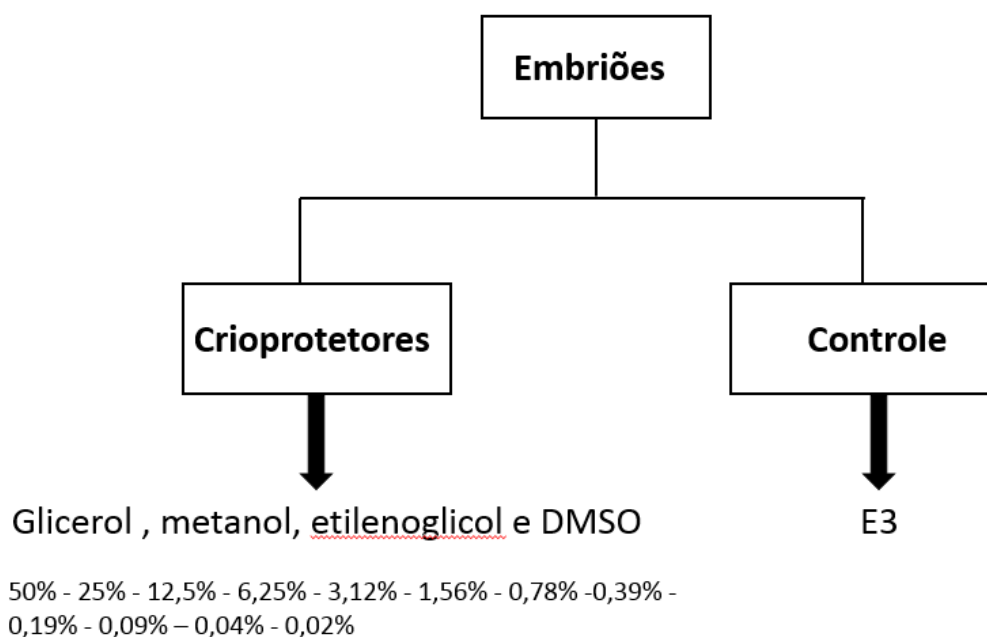


Figura 6. Esquema do experimento, onde o grupo teste utiliza diferentes crioprotetores e diferentes concentrações e o controle mantém os embriões em E3.

Os mesmos testes foram realizados em temperatura refrigerada, sendo o mesmo número de repetições e embriões utilizados. Porém os embriões foram mantidos, em incubadoras experimentais (PAULA et al. 2014), com oxigenação constante, durante todo o teste. Foram mantidos 5 embriões por incubadora, em um total de 200 ml de crioprotetor+E3, sendo as concentrações utilizadas as mesmas da temperatura ambiente. Foram realizadas 5 repetições por concentração, perfazendo um total de 20 embriões/concentração/crioprotetor. A curva de resfriamento da geladeira foi de 1,25 C/hora, onde a temperatura inicial foi de 22°C e a final de 7°C, sendo caracterizado como resfriamento lento. Para o controle foram utilizados embriões em incubadoras contendo 200 ml de E3.

A avaliação destes embriões seguiu a mesma metodologia para embriões em temperatura ambiente, sendo usada as mesmas fases. Para tanto os embriões eram retirados da geladeira, avaliados rapidamente em fotomicroscópio e posteriormente retornados as incubadoras. Os embriões foram mantidos por 96 horas em refrigeração, sendo avaliados a cada 24 horas.

4.4 Avaliação estatística

Para avaliar a dispersão dos dados, e o limite inferior e superior da concentração letal do crioprotetor em temperatura ambiente ou resfriada foi utilizado a regressão do tipo probit, através do teste foi obtido um gráfico com curva resposta e equação. Utilizando os valores de R^2 é possível verificar a variabilidade e a repetibilidade dos dados, podendo informar quais os melhores crioprotetores para o uso na técnica com embriões de peixes.

A taxa de mortalidade foi realizada através de média percentual. Para avaliar a diferença entre a mortalidade dos embriões em temperatura resfriada ou ambiente foi utilizado o software BioEstat, sendo realizada uma análise de qui quadrado, para o valor de p e o valor de odd ration, para verificar se os embriões mantidos em diferentes concentrações de crioprotetores tinham maiores chances de morrerem do que aqueles mantidos somente em E3. As comparações foram realizadas utilizando crioprotetores a temperatura ambiente x controle negativo; crioprotetores a temperatura resfriada x controle negativo e crioprotetores a temperatura resfriada x crioprotetores a temperatura ambiente.

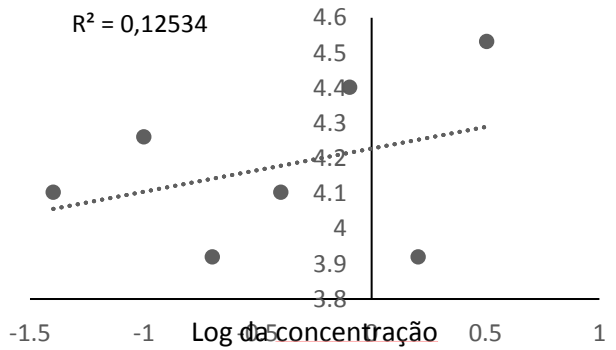
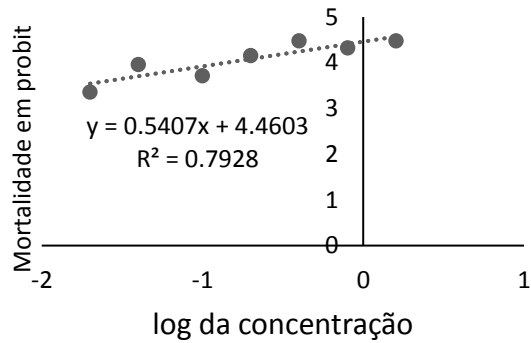
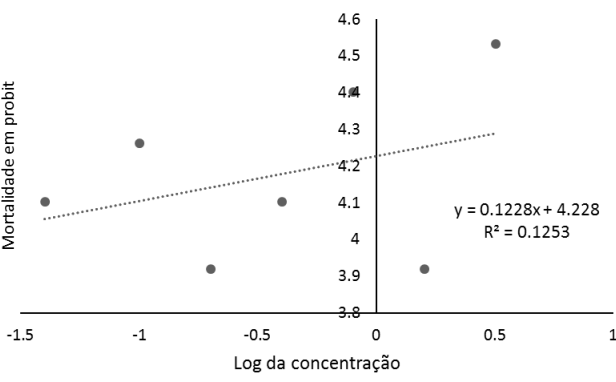
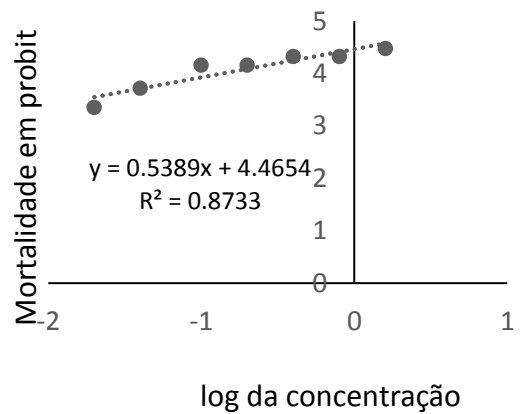
5. RESULTADOS

5.1 Toxicidade do metanol em temperatura ambiente e resfriada

A mortalidade causada pelo metanol em temperatura ambiente foi mais dispersa, isso porque com 48 horas e 96 horas as taxas de mortalidade eram muito diferentes entre as concentrações testadas. Avaliando os gráficos em probit é possível observar que para todas as concentrações e tempos de exposição houve elevada taxa de mortalidade. Porém com 24 horas e 72 horas as taxas de mortalidade foram semelhantes entre as diferentes concentrações, o que não aconteceu com os tempos de exposição 48 e 96 hpf. Isso é perceptível quando se avalia o R^2 (Figura 7).

As análises de regressão usando o probit determinam a concentração letal 50 (CL50). Com 24 hpf a CL 50 nos embriões mantidos em temperatura ambiente foi de 5%, e conforme o tempo de exposição aumenta esta também aumenta.

Em temperatura resfriada a curva resposta de toxicidade do metanol, em todos os períodos de observação apresentou crescimento exponencial da mortalidade, sem que houvesse discrepâncias significativas entre as concentrações nos diferentes tempos de exposição (Figura 7). A CL50 em temperatura resfriada para 24 horas de exposição foi de 9,77% não variando de maneira discrepante nos diferentes tempos de exposição. Ao final da observação, com 96 horas de exposição a CL50 foi de 10,54 (Figura 7).

	Temperatura ambiente (TA)	CL 50 (LI/LS) TA	Temperatura resfriada (TR)	CL 50 (LI/LS) TR
24 hpf	$y = 0.1228x + 4.228$ $R^2 = 0,12534$ 	5% (1,45%; 13,11)		9,77% (6,46%; 14,75%)
48 hpf		8,15% (1,54%;10,6 %)		9,87% (6,78%;15, 1%)

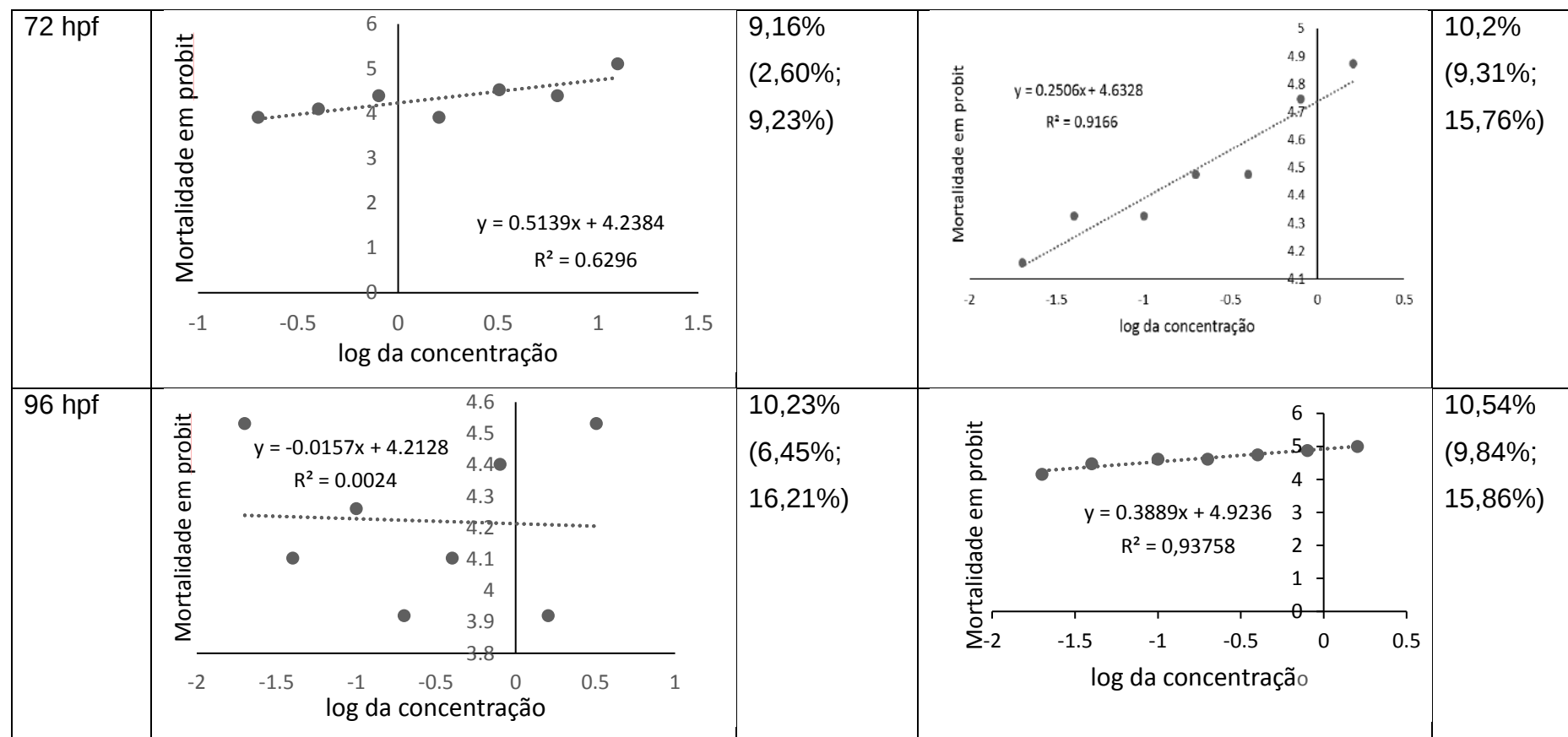


Figura 7. Concentração letal 50 (CL50) e limite superior e inferior (LS/LI) dos dados da regressão em probit, indicando a mortalidade acumulada dos embriões nas diferentes concentrações e tempos de exposição testados. Concentrações que causaram 100% de mortalidade ou nenhuma mortalidade foram excluídas dos resultados. Mortalidade de embriões de zebrafish expostos a metanol em temperatura ambiente.

Dentro das primeiras 24 horas tanto em temperatura ambiente como resfriada, as concentrações de 50% e 25% causaram mortalidade total na fase de blástula. A mortalidade é menor nas concentrações de 12,5%, 6,25% para os embriões mantidos resfriados, quando comparados com temperatura ambiente. Para as demais concentrações a mortalidade é baixa tanto para temperatura ambiente quanto resfriada.

Para fase de gástrula, concentrações de 12, 5% e 6,25% apresentaram menor mortalidade em temperatura resfriada que ambiente. A partir de 3,2% essa diferença de mortalidade diminui, sendo que concentrações a partir de 0,19% tem maior mortalidade em temperatura resfriada.

Já para a fase de fechamento de blastóporo concentrações até 6,25% matam praticamente 100% dos embriões, com exceção dos embriões resfriados a 6,25%. Nas concentrações entre 3,2% e 0,09% a mortalidade em temperatura resfriada é menor que em temperatura ambiente. Demonstrando uma diminuição da toxicidade do metanol sob temperaturas baixas. Porém temperaturas abaixo de 0,04% apresentam mortalidade embrionária maior em temperatura resfriada (Figura 8).

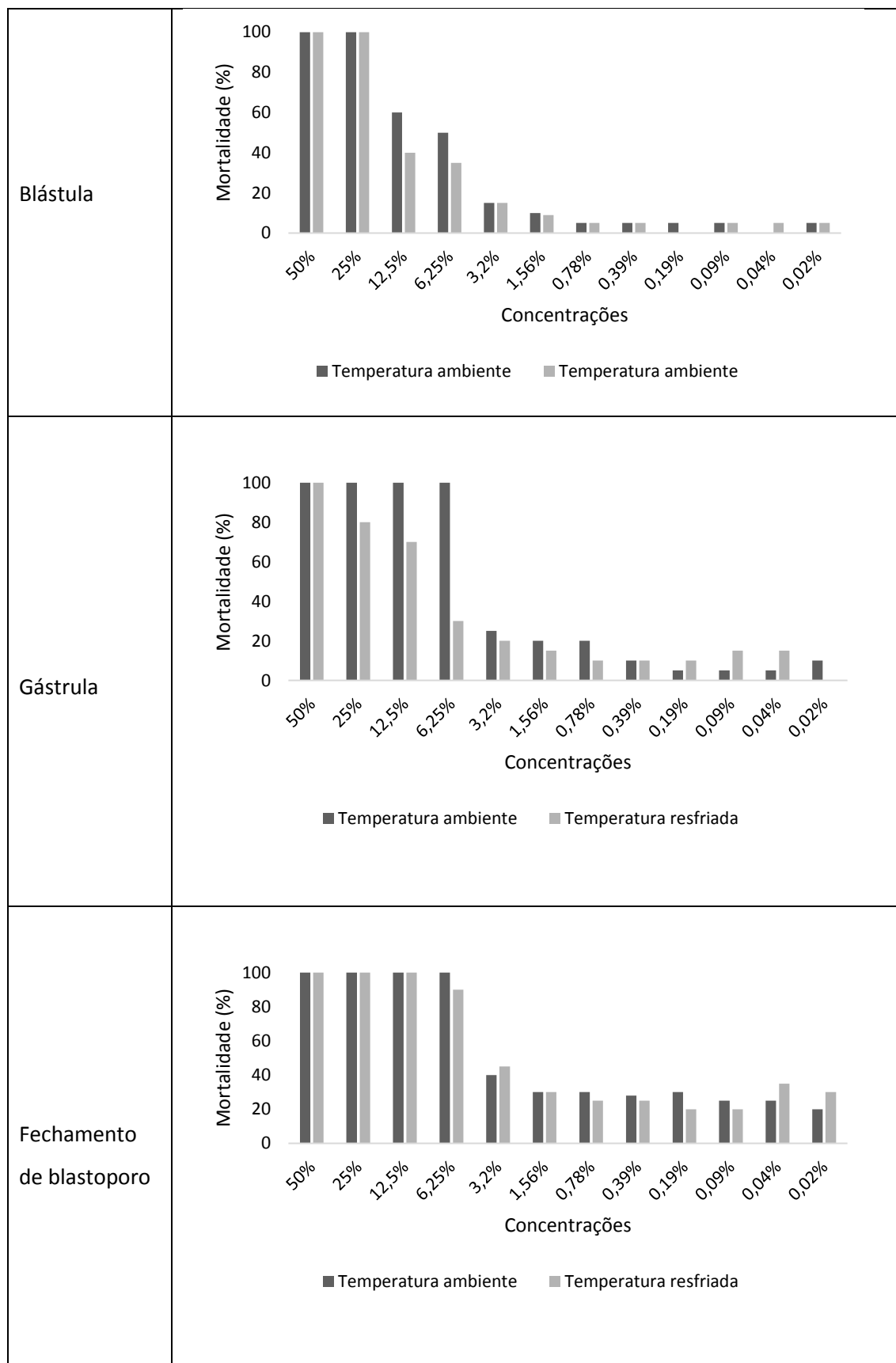


Figura 8. Taxa de mortalidade em diferentes fases de desenvolvimento de embriões expostos a metanol em temperatura ambiente e resfriada.

Com 24 horas de exposição ao metanol, as concentrações de 50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 3,12% apresentaram 100% de mortalidade tanto para temperatura ambiente quanto para temperatura resfriada. Já as concentrações que vão de 1,56% a 0,02% promoveram mortalidade embrionária, sendo que quanto maior a concentração de metanol/tempo de exposição, maior a mortalidade, apresentando um efeito concentração/tempo dependente. A taxa de mortalidade do grupo controle foi de 9% (Figura 9). Comparando os resultados de taxa de mortalidade em temperatura ambiente e resfriada é perceptível um diferente comportamento criotóxico do metanol em relação aos tempos de exposição e concentrações utilizadas.

Em temperatura ambiente com 24 horas de exposição existe uma constância de mortalidade embrionária independente da concentração de metanol utilizada. Esta constância foi confirmada pelo gráfico do probit (r^2). Em temperatura resfriada concentrações intermediárias de 0,39%, 0,19% e 0,04% apresentaram mortalidade reduzida em temperatura resfriada. Concentrações acima de 0,39% tem maior toxicidade, enquanto concentrações abaixo de 0,04% também apresentam alta taxa de mortalidade. A exposição a metanol em temperatura resfriada causou mortalidade de 15 a 5% entre as concentrações menores que 1,56%, ao final das 96 de exposição (Figura 9).

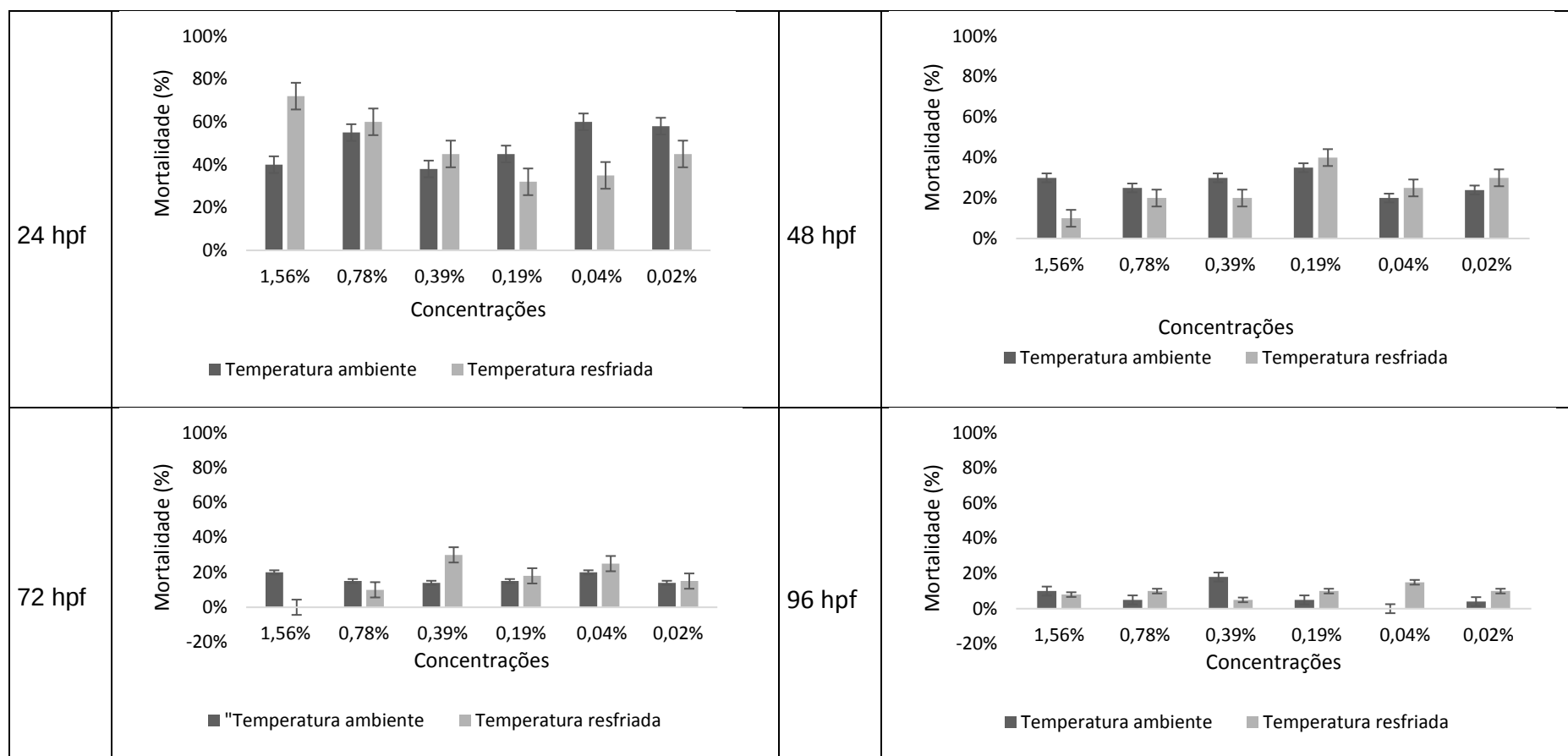


Figura 9. % de mortalidade por concentração de metanol em diferentes tempos de exposição, comparando temperatura ambiente e resfriada.

A comparação das médias de mortalidade em temperatura ambiente por período de exposição variou quando a comparação ocorreu entre 24 e 48 hpf e entre os períodos de 72 e 96 hpf com $p > 0,001$. Comparar as médias de mortalidade por período em temperatura resfriada ocorreu diferença significativa apenas entre 24 e 48 hpf, após as taxas de mortalidades não variam muito entre si dentro do mesmo período (Quadro 1).

Foi observada diferença estatística nas taxas de mortalidade quando comparados os períodos de exposição ao metanol 24-48 horas ($p < 0,05$) para as concentrações 0,78%, 0,04% e 0,02%. As taxas de mortalidade foram diferentes nos tempos de exposição 48-72 horas para a concentração 0,39%. Para o período de exposição entre 72 e 96 horas não houve diferença estatística para as diferentes concentrações testadas. Já para temperatura resfriada apenas houve diferença estatística para mortalidade para a concentração de 0,78% no tempo de exposição de 72-96 horas.

Quadro 1. Valores de p, indicando se existe diferença significativa entre as mortalidades por tempo de exposição a metanol em temperatura ambiente e resfriada.

	Temperatura ambiente			Temperatura resfriada		
	24 - 48	48 - 72	72 - 96	24 - 48	48 - 72	72 -96
1,56%	0,067	0,065	0,076	0,05	0,065	0,493
0,78%	0,004	0,078	0,098	0,07	0,078	0,001
0,39%	0,074	0,005	0,096	0,873	0,05	0,088
0,19%	0,068	0,05	0,452	0,298	1,0	0,194
0,09%	0,05	0,123	0,088	0,598	0,634	0,172
0,04%	0,003	1,005	0,05	0,647	0,785	0,091
0,02%	0,004	0,732	0,062	0,363	0,872	0,172

Comparando a taxa de mortalidade dos tratamentos com os controles, foi observado que em temperatura ambiente a mortalidade do metanol apresentou diferenças significativas com $p > 0,0051$ em relação ao controle em todas as concentrações, demonstrando a toxicidade do metanol. Porém em temperatura resfriada o metanol provocou mortalidade significativa em relação ao controle

para as concentrações acima de 0,04% (Quadro 2), mostrando que a toxicidade do metanol se altera quando em temperaturas abaixo da ambiente. O odds ration acima de 1 indica a capacidade do metanol em aumentar a mortalidade em relação ao controle, independente da temperatura.

Quadro 2. Valores de mortalidade (%), p e odd ration para cada concentração de metanol após as 96 horas de exposição em temperatura ambiente e resfriada.

	Temperatura ambiente			Temperatura resfriada		
	Mortalidade (%)	Valor de p	Odds ration	Mortalidade (%)	Valor de p	Odds ration
1,56%	40	0,0002	0,099	50	< 0,0001	0,024
0,78%	60	< 0,0001	0,006	45	< 0,0001	0,039
0,39%	55	< 0,0001	0,008	40	< 0,0001	0,054
0,19%	50	< 0,0001	0,010	35	0,0002	0,089
0,09%	50	< 0,0001	0,010	25	0,0011	0,140
0,04%	50	< 0,0001	0,010	25	0,0011	0,140
0,02%	30	0,05	0,100	40	0,072	0,054

Comparando as taxas de mortalidade das diferentes concentrações ao final das 96 horas de exposição é possível observar que as concentrações abaixo de 3,2% de metanol provocaram menor mortalidade em temperatura resfriada quando comparada com a temperatura ambiente (Quadro 3).

Quadro 3: Comparação entre a taxa percentual de mortalidade das concentrações de metanol em temperatura ambiente e resfriada e o valor de p.

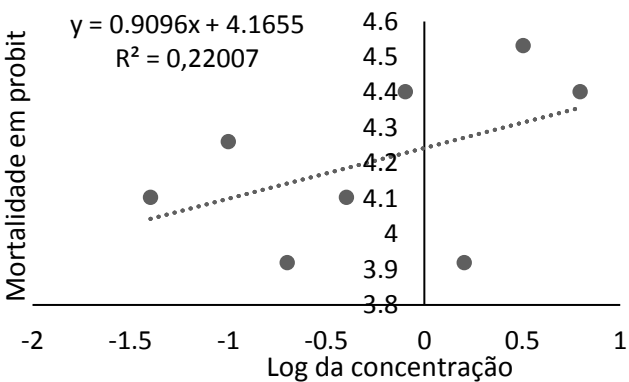
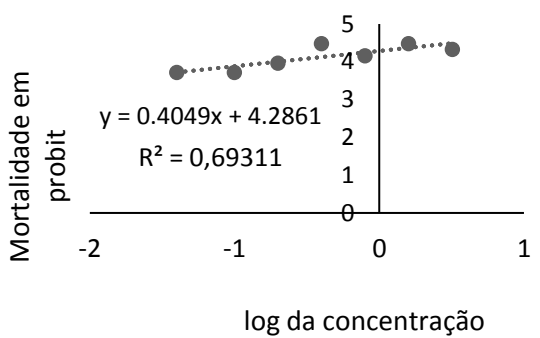
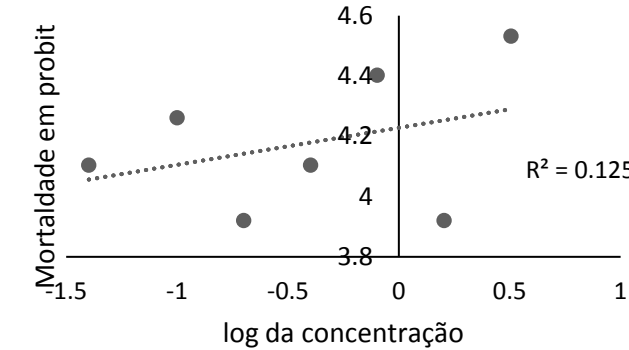
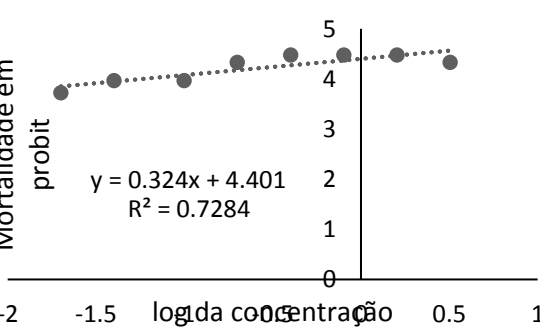
	Temperatura ambiente	Temperatura resfriada	p
50	100	100	0,1478
25	100	100	0,5976
12.5	100	100	0,7543
6.25	100	100	0,2864
3.2	100	100	0,1543
1.56	40	50	< 0.0001
0.78	60	45	< 0.0001
0.39	55	40	< 0.0001
0.19	50	35	< 0.0001
0.09	50	35	< 0.0001
0.04	50	30	< 0.0001
0.02	30	20	< 0.0001

4.2 Toxicidade do DMSO em temperatura ambiente e resfriada em embriões expostos por 96 horas

A mortalidade causada pelo DMSO a temperatura ambiente foi variável independente do tempo ou da concentração, conforme observado nos gráficos

probit apresentados no Quadro 4. Já em temperatura ambiente O DMSO seguiu uma curva resposta e com taxa de mortalidade aumentando conforme o aumento da concentração. Em concentrações menores o valor da mortalidade aumentou, principalmente ao final do tempo de exposição (Figura 10).

É possível observar que em temperatura resfriada as CL50 do DMSO são maiores, demonstrando uma redução da toxicidade deste quando em temperaturas menores que a ambiente (Figura 10).

	Temperatura ambiente (TA)	CL 50 (LI/LS) TA	Temperatura resfriada (TR)	CL 50 (LI/LS) TR
24 hpf	 $y = 0.9096x + 4.1655$ $R^2 = 0,22007$	8,12% (6,57%; 10,04)	 $y = 0.4049x + 4.2861$ $R^2 = 0,69311$	7,9% (5,6%; 9,7%)
48 hpf	 $R^2 = 0.1253$	9,5% (6,30%; 9,56%)	 $y = 0.324x + 4.401$ $R^2 = 0.7284$	6,8% (5,2%; 8,7%)

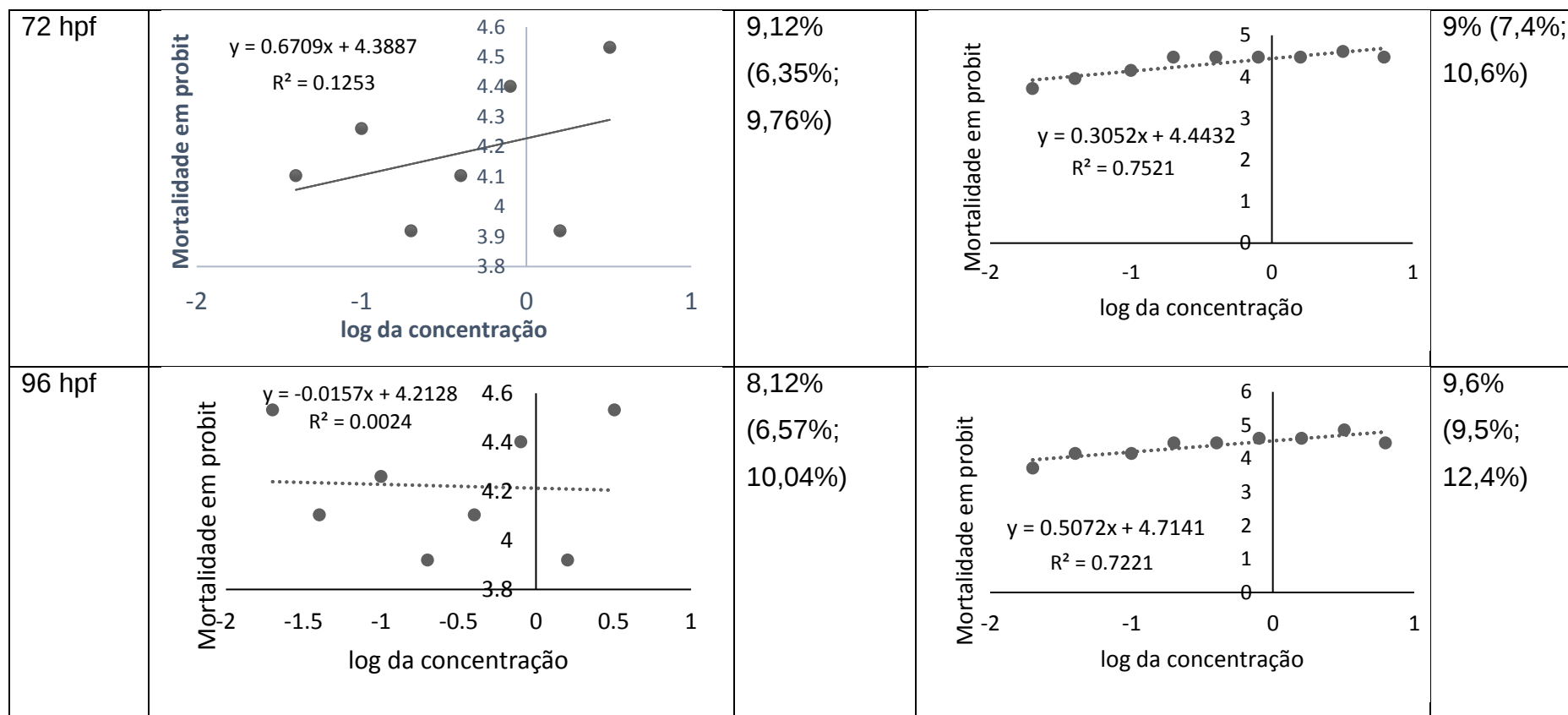


Figura 10. Concentração letal 50 (CL50) e limite superior e inferior (LS/LI) dos dados da regressão em probit, indicando a mortalidade acumulada dos embriões nas diferentes concentrações e tempos de exposição testados. Concentrações que causaram 100% de mortalidade ou nenhuma mortalidade foram excluídas dos resultados. Mortalidade de embriões de zebrafish expostos a DMSO em temperatura ambiente.

Para a fase de blastula as concentrações de 50% e 25% promoveram a morte de 100% dos embriões para a fase de blástula, gástrula e fechamento de blastóporo (Figura 11). Essa mortalidade é diminuída a partir da concentração de 12,5%, quando em temperatura ambiente houve uma maior mortalidade que em temperatura resfriada. A partir desta concentração a mortalidade em temperatura resfriada foi maior que em temperatura ambiente, demonstrando o efeito letal da temperatura sobre o desenvolvimento embrionário.

Para a fase de gástrula as taxas de mortalidade foram maiores em temperatura resfriada a partir de 6,25% de DMSO. Porém em fechamento de blastóporo tanto as concentrações de 12,5% quanto de 6,25% apresentaram aproximadamente 100% de mortalidade. Não houve diferença de mortalidade em fechamento de blastoporo.

Em temperatura ambiente com 48 hpf e após esse período a taxa de mortalidade diminuiu relativamente, sendo que ao final das 96 horas as concentrações 3,12%, 0,78% e 0,02% não apresentaram mortalidade (Figura 11). O DMSO em temperatura resfriada provocou taxa de mortalidade menor do que em temperatura ambiente durante as primeiras 24 hpf em concentrações de 3,12% a 0,78%. Em concentrações menores, 0,04% e 0,02%, a taxa de mortalidade foi maior do que em temperatura ambiente (Figura 12).

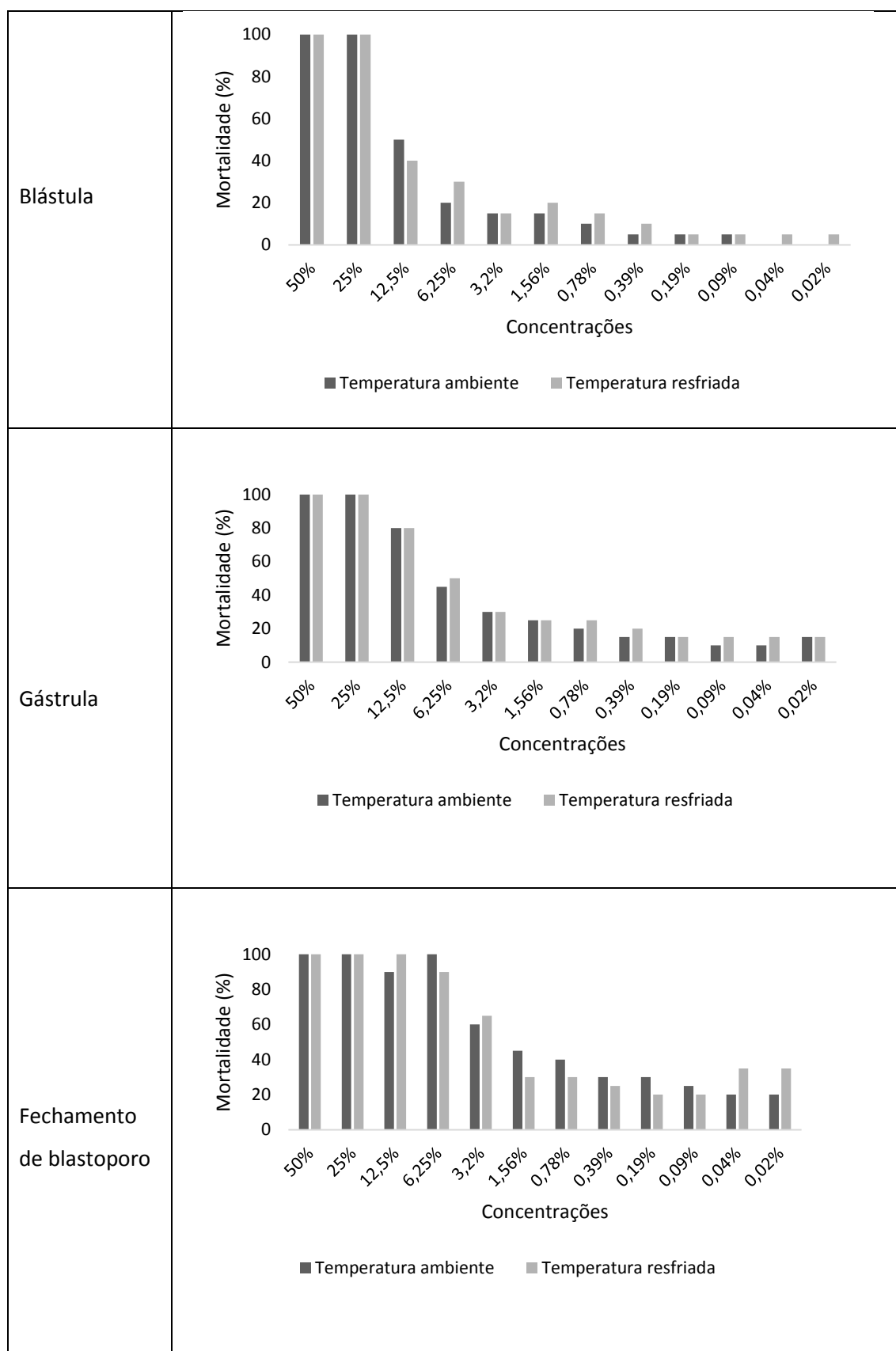


Figura 11. Taxa de mortalidade em diferentes fases de desenvolvimento de embriões expostos a DMSO em temperatura ambiente e resfriada.

O DMSO tanto em temperatura ambiente como em resfriada, nas concentrações de 50% até 6,25% promoveram mortalidade de 100% dos embriões. Em temperatura resfriada a taxa de mortalidade na concentração de 3,12% foi menor do que em temperatura resfriada. O grupo controle negativo do meio resfriado teve maior taxa de mortalidade (Figura 12).

Em relação a concentração e tempo de exposição ao DMSO em todas as temperaturas a mortalidade foi maior durante as primeiras 24 hpf. Nas duas concentrações mais baixas a taxa de mortalidade dos embriões foi maior em temperatura resfriada.

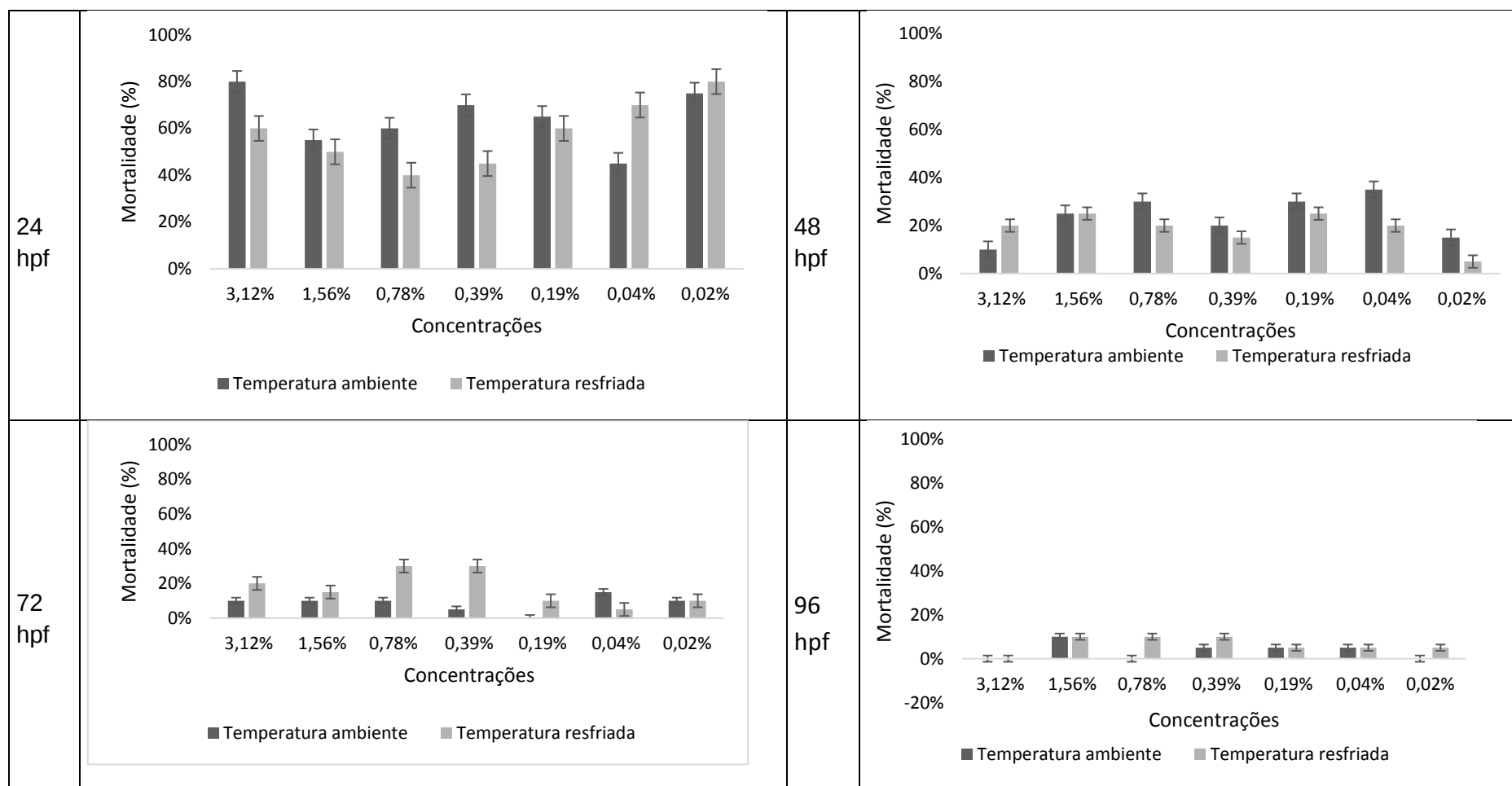


Figura 12. Taxa de mortalidade pelo tempo de exposição ao DMSO em temperatura ambiente e resfriada.

A comparação das médias em temperatura ambiente indicou diferença significativa na taxa de embriões expostos a DMSO apenas no período de 24 – 48 horas. A média das taxas de mortalidade foram significativamente diferentes em temperatura resfriada também no período de 24 – 48 hpf para as concentrações abaixo de 0,19% mostrando que possivelmente no período inicial o embrião foi mais sujeito a toxicidade ou aos danos do resfriamento (Quadro 4).

Quadro 4. Valores de p, indicando se existe diferença significativa entre as mortalidades por tempo de exposição a DMSO em temperatura ambiente e resfriada.

	Temperatura ambiente			Temperatura resfriada		
	24 - 48	48 - 72	72 - 76	24 - 48	48 - 72	72 -96
3,12%	0,007	0,458	0,376	0,05	0,139	0,378
1,56%	0,05	0,126	0,134	0,05	0,356	0,075
0,78%	0,043	0,078	0,096	0,058	0,195	0,087
0,39%	0,084	0,005	0,234	0,074	0,267	0,165
0,19%	0,058	0,075	0,067	0,004	0,096	0,982
0,09%	0,05	0,123	0,088	0,059	0,058	0,083
0,04%	0,135	1,005	0,078	0,05	0,561	0,863
0,02%	0,009	0,732	0,097	0,003	0,176	0,456

Das doze concentrações de DMSO testadas em temperatura ambiente, as que tiveram diferenças significativas de mortalidade em relação ao controle

foram aquelas acima de 0,78%, indicando que abaixo dessa concentração a morte embrionária pode não ter sido causada pela presença do DMSO (Quadro 5).

As concentrações de DMSO em temperatura resfriada que mostraram diferenças significativas na taxa de mortalidade em relação ao controle foram as acima de 0,78%, mesmo resultado encontrado para a temperatura ambiente. Concentrações menores de 0,04% tiveram odds ration mais alto, como a 0,02% que tem chances 0,648 vezes de sobreviver em relação ao controle (Quadro 5).

Quadro 5. Valores de mortalidade (%), p e old ration para cada concentração de DMSO após as 96 horas de exposição em temperatura ambiente e resfriada.

	Temperatura ambiente			Temperatura resfriada		
	Mortalidade (%)	Valor de p	Odds ration	Mortalidade (%)	Valor de p	Odds ration
3,12%	75	< 0,0001	0,022	35	< 0,0001	0,203
1,56%	30	0,0051	0,158	35	< 0,0001	0,203
0,78%	10	< 0,0001	0,600	45	< 0,0001	0,087
0,39%	0	0,724	8	27	0,020	0,536
0,19%	20	0,430	0,2667	19	0,724	0,620
0,09%	10	0,5655	0,600	27	0,005	0,536
0,04%	10	0,5655	0,600	10	0,1356	0,845
0,02%	15	0,2205	0,2108	15	0,220	0,648

Comparando o percentual da taxa de mortalidade em temperatura ambiente e resfriada as concentrações de 50% a 1,56%% apresentam

diferenças significativas (Quadro 6). Concentrações abaixo de 0,78% até 0,04% têm menor mortalidade em temperatura resfriada que a ambiente.

Quadro 6: Comparação entre a taxa percentual de mortalidade das concentrações de DMSO em diferentes temperaturas e o valor de p.

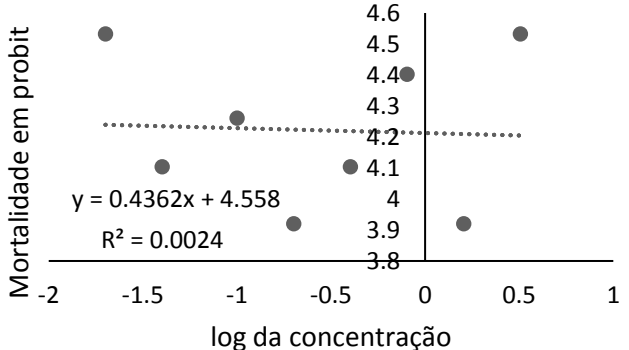
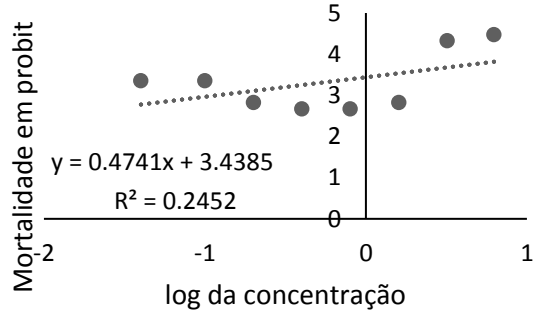
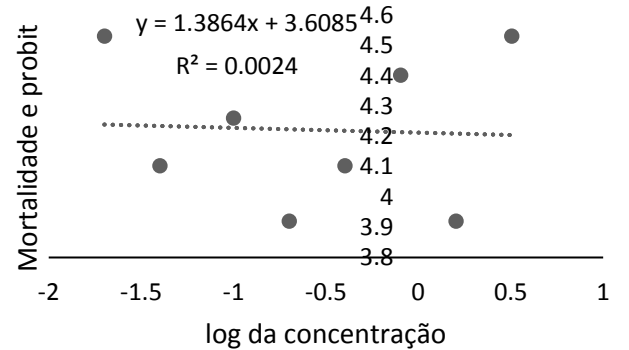
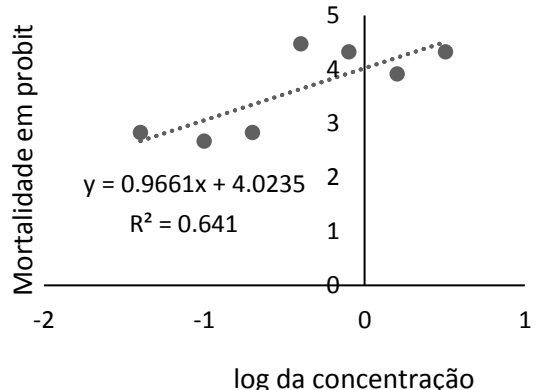
	Temperatura ambiente	Temperatura resfriada	p
50	100	100	0,1697
25	100	100	0,5432
12.5	100	100	0,5098
6.25	100	100	0,6738
3.2	75	45	< 0.0001
1.56	30	35	0,0678
0.78	10	35	< 0.0001
0.39	0	30	< 0.0001
0.19	20	30	0.0003
0.09	10	20	0.0018
0.04	10	20	0.0018
0.02	15	10	0,0897

5.3 Toxicidade do etilenoglicol em temperatura ambiente e resfriada em embriões expostos por 96 horas

A taxa de mortalidade de etilenoglicol de 50% a 6,25% foi de 100% tanto em temperatura ambiente como em resfriada. O probit do etilenoglicol em temperatura ambiente mostrou a taxa de mortalidade variando em torno da curva resposta em todos os períodos de avaliação. Os dados com 96 horas de

exposição em algumas concentrações não tiveram crescimento exponencial, como na concentração de 1,56% que teve mortalidade abaixo do esperado pela curva (Figura 13).

Os dados de mortalidade do etilenoglicol em temperatura resfriada seguiram a curva resposta esperado pelo probit. A maior taxa de mortalidade foi encontrada no período final da observação (Figura 13). Assim como na temperatura ambiente, a CL50 do etilenoglicol em temperatura resfriada foi diminuindo conforme o aumento do tempo de exposição. Com a observação de 96 hpf o valor da CL50 foi de 10% em temperatura resfriada e em temperatura ambiente foi de 8,6%.

	Temperatura ambiente (TA)	CL 50 (LI/LS) TA	Temperatura resfriada (TR)	CL 50 (LI/LS) TR
24 hpf	 Mortalidade em probit $y = 0.4362x + 4.558$ $R^2 = 0.0024$ log da concentração	10,23% (11,41%; 16,53%)	 Mortalidade em probit $y = 0.4741x + 3.4385$ $R^2 = 0.2452$ log da concentração	10,6% (12,5%; 13,64%)
48 hpf	 Mortalidade e probit $y = 1.3864x + 3.6085$ $R^2 = 0.0024$ log da concentração	10% (7,6%; 14%)	 Mortalidade em probit $y = 0.9661x + 4.0235$ $R^2 = 0.641$ log da concentração	10,23% (8,41%; 12,44%)

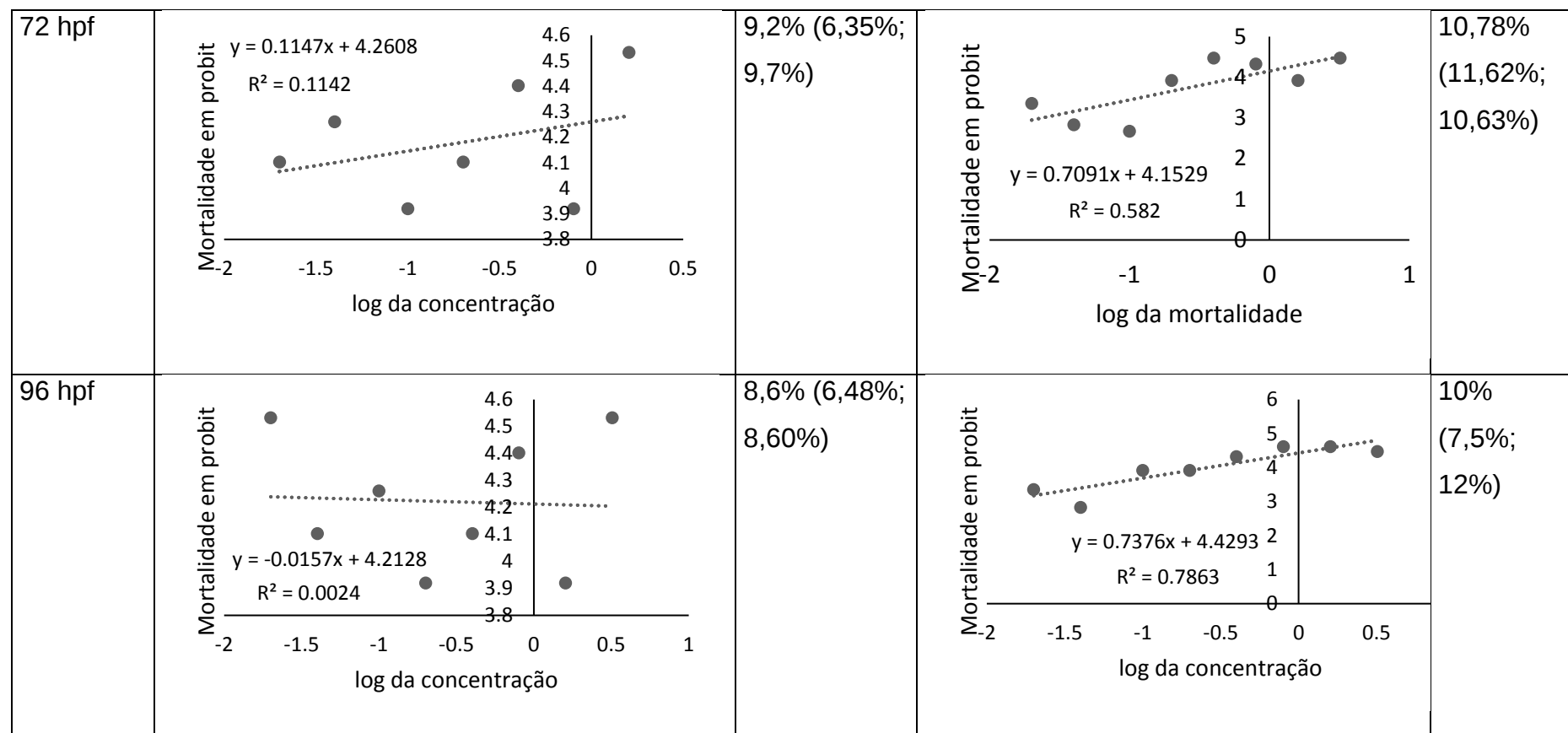


Figura 13. Concentração letal 50 (CL50) e limite superior e inferior (LS/LI) dos dados da regressão em probit, indicando a mortalidade acumulada dos embriões nas diferentes concentrações e tempos de exposição testados. Concentrações que causaram 100% de mortalidade ou nenhuma mortalidade foram excluídas dos resultados. Mortalidade de embriões de zebrafish expostos a etilenoglicol em temperatura ambiente.

Assim como os outros crioprotetores, o etilenoglicol causa 100% de mortalidade já na fase de blástula, sendo que períodos iniciais de desenvolvimento embrionário parecem ser mais sensíveis ao efeito tóxico (Figura 14). Em temperatura resfriada, para blástula, a taxa de mortalidade do etilenoglicol foi menor do que em meio resfriado a partir da concentração 3.12%, exceto nas concentrações 0,04% e 0,02%, indicando efeito do resfriamento sobre o desenvolvimento embrionário apesar do crioprotetor (Figura 15).

Porém observando os resultados para gástrula e fechamento de blastóporo apenas na concentração de 3,2% as taxas de mortalidade do meio resfriado foram menores que do meio em temperatura ambiente.

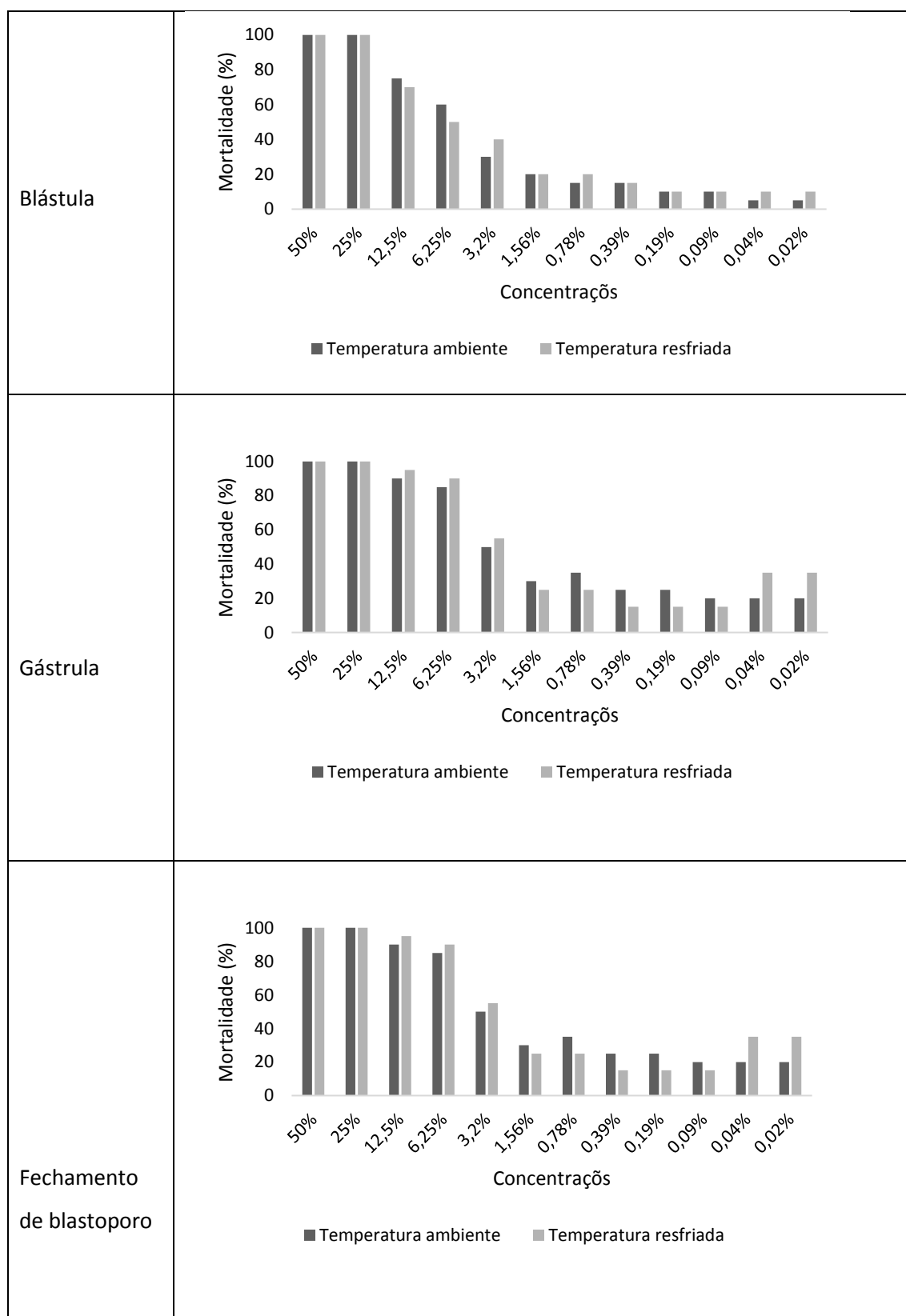


Figura 14. Taxa de mortalidade em diferentes fases de desenvolvimento de embriões expostos a etilenoglicol em temperatura ambiente e resfriada.

A figura 15 mostra as taxas de mortalidade para os embriões submetidos a diferentes concentrações de crioprotetores e tempos de exposição. É possível perceber que as primeiras 24 horas de exposição promovem alta taxa de mortalidade. Que decaem durante os outros períodos de exposição. Com 24 e 48 horas de exposição a concentração de 0,39% promove maiores taxas de mortalidade em temperatura ambiente. Já com 0,78% as taxas de mortalidade embrionária são semelhantes para 78 e 96 horas de exposição.

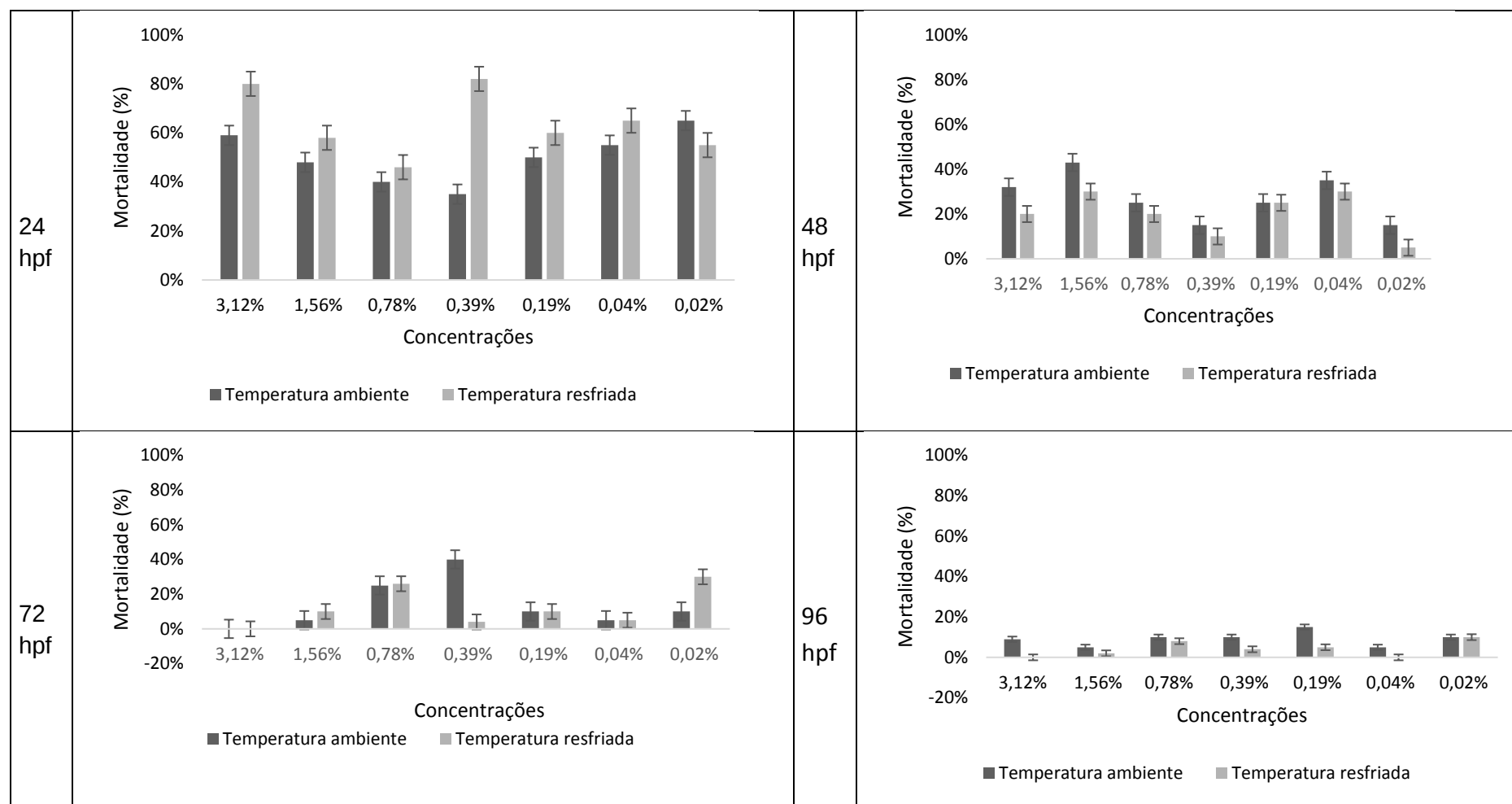


Figura 15. Taxa de mortalidade pelo tempo de exposição ao etilenoglicol em temperatura ambiente e resfriado

As médias de mortalidade por período mostraram que em temperatura ambiente houve diferenças significantes entre o período de 24 – 48 hpf nas concentrações 3,12%, 0,04%, 0,02%, e no período entre 48 – 72 hpf a concentração que apresentaram diferença foi 0,04%. Em temperatura resfriada as médias de mortalidade variavam significativamente apenas no período de 24 -48 nas concentrações de 3,12%, 0,39%, 0,19% e 0,02% (Quadro 7).

Quadro 7. Valores de p, indicando se existe diferença significativa entre as mortalidades por tempo de exposição a etilenoglicol em temperatura ambiente e resfriada.

	Temperatura ambiente			Temperatura resfriada		
	24 - 48	48 - 72	72 - 76	24 - 48	48 - 72	72 - 96
3,12%	0,05	0,05	1	0,008	1	1
1,56%	0,598	0,967	0,539	0,721	0,434	0,387
0,78%	0,079	0,069	0,776	0,079	0,069	0,776
0,39%	0,054	0,051	0,049	0,005	0,654	1
0,19%	0,051	0,776	0,967	0,043	0,196	0,808
0,09%	0,053	0,078	0,102	0,087	0,09	0,092
0,04%	0,05	0,05	1	0,057	0,08	0,095
0,02%	0,003	0,739	1	0,003	0,567	0,630

Em temperatura ambiente a taxa de mortalidade das concentrações de etilenoglicol quando comparadas com o controle negativo foram todas

significativas. O valor de odds ration aumentou conforme a concentração diminuía, aumentando assim as chances de sobrevivência desses embriões em relação ao controle. As taxas de mortalidade dos embriões expostos a etilenoglicol em temperatura resfriada se mostraram significativas em relação ao controle em concentrações acima de 0,09%, enquanto concentrações abaixo desse valor parecem não terem efeito sobre os embriões (Quadro 8).

Quadro 8. Valores de mortalidade (%), p e old ration para cada concentração de DMSO após as 96 horas de exposição em temperatura ambiente e resfriada.

	Temperatura ambiente			Temperatura resfriada		
	Mortalidade (%)	Valor de p	Odds ration	Mortalidade (%)	Valor de p	Odds ration
3,12%	90	< 0,0001	0,0002	70	< 0,0001	0,052
1,56%	75	< 0,0001	0,078	65	0,002	0,0807
0,78%	60	< 0,0001	0,077	65	0,002	0,0807
0,39%	35	0,0101	0,215	25	0,006	0,1304
0,19%	52	0,001	0,348	20	0,026	0,1739
0,09%	50	0,001	0,218	20	0,026	0,1739
0,04%	55	< 0,0001	0,196	15	0,099	0,2564
0,02%	50	0,001	0,218	5	0,869	0,8261

A significância das diferenças nas taxas de mortalidade a exposição de etilenoglicol nas temperaturas ambiente e resfriada foi encontrada em temperaturas abaixo de 6,25%, sendo que no meio resfriado a mortalidade foi menor do que na temperatura ambiente (Quadro 9).

Quadro 9: Comparação entre a taxa percentual de mortalidade das concentrações de etilenoglicol em diferentes temperaturas e o valor de p.

	Temperatura ambiente	Temperatura resfriada	p
50	100	100	0,1478
25	100	100	0,5976
12.5	100	100	0,7543
6.25	100	100	0,2864
3.2	100	70	< 0.0001
1.56	75	65	< 0.0001
0.78	60	65	< 0.0001
0.39	35	25	< 0.0001
0.19	52	20	< 0.0001
0.09	50	20	< 0.0001
0.04	55	15	< 0.0001
0.02	50	5	< 0.0001

4.4 Toxicidade do glicerol em temperatura ambiente e resfriada em embriões expostos por 96 horas

A taxa de mortalidade cumulativa do glicerol em temperatura ambiente apresentou maior variação de mortalidade. Os resultados da mortalidade tiveram

crescimento exponencial em temperatura ambiente em relação a concentração ao final das 96 horas de exposição onde os resultados ficaram mais próximos da curva resposta projetada (Figura 16).

A CL50 do glicerol em temperatura ambiente variou no período de 48 hpf alcançando o valor de 10%. Os outros períodos de observação mantiveram o valor da CL50 em torno de 8%, mostrando que o tempo de exposição não aumenta a toxicidade do composto.

Em temperatura resfriada com 96 hpf a exposição do glicerol seguiu o esperado pela curva resposta e com crescimento exponencial da mortalidade em relação ao aumento da concentração. O momento de maior variação dos resultados assim como na temperatura ambiente foi o período de 48 hpf (Figura 16). A CL50 em temperatura resfriada sofreu aumento conforme o desenvolvimento do zebrafish avançava, chegando a 11,16%, com limite inferior de 9,6% e superior de 15,1%. Esse aumento da CL 50 também está relacionado com a temperatura resfriada, que apresenta maiores CL50 quando comparado com a temperatura ambiente.

	Temperatura ambiente (TA)	CL 50 (LI/LS) TA	Temperatura resfriada (TR)	CL 50 (LI/LS) TR
24 hpf	$y = 0.6709x + 4.3887$ $R^2 = 0.2201$	8,18% (7%; 15,6%)	$y = 0.2533x + 4.0176$ $R^2 = 0.1888$	8,18% (7%; 15,8%)
48 hpf	$y = 0.143x + 4.2428$ $R^2 = 0.2201$	10% (7,56%; 15,8%)	$y = 0.1955x + 4.2254$ $R^2 = 0.3846$	8,65% (7,5%; 10,8%)

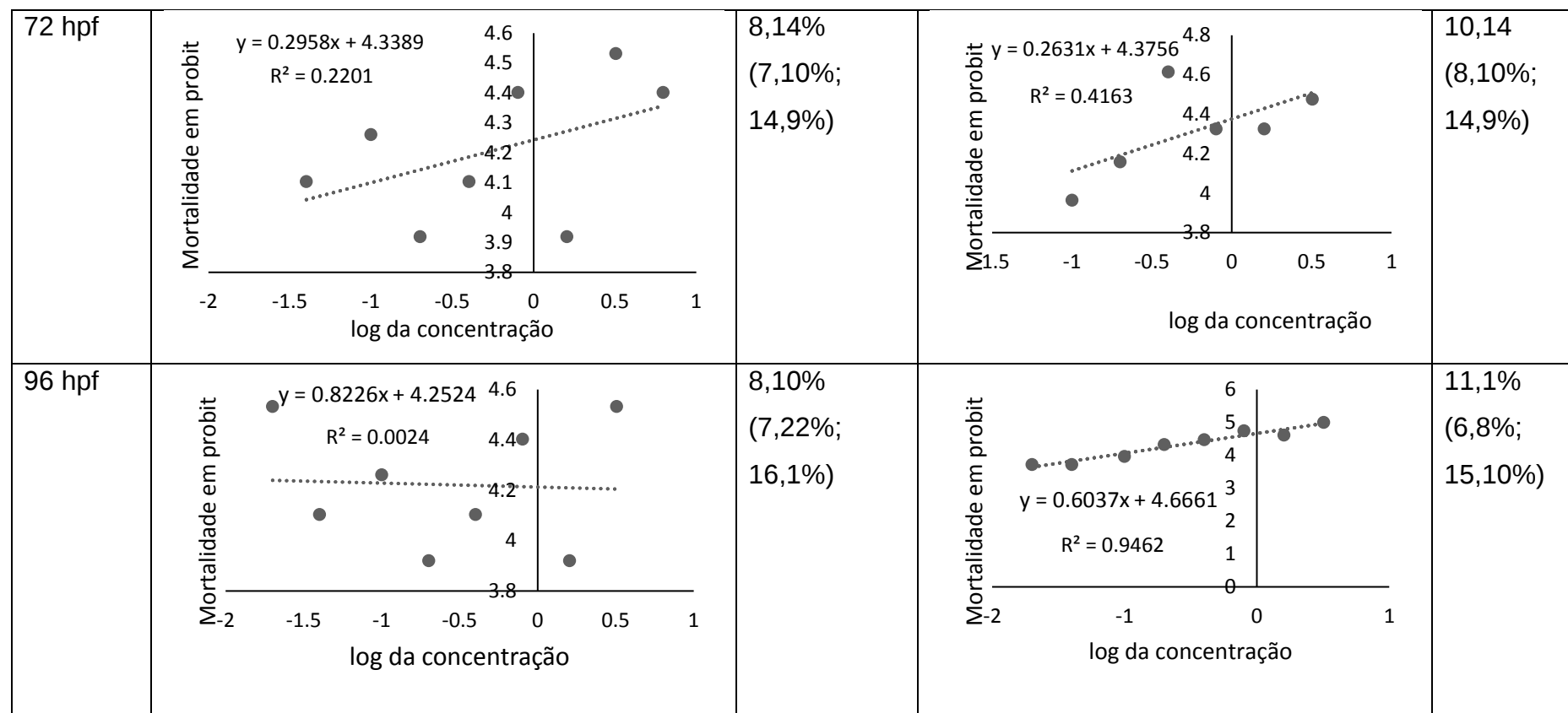


Figura 16. Concentração letal 50 (CL50) e limite superior e inferior (LS/LI) dos dados da regressão em probit, indicando a mortalidade acumulada dos embriões nas diferentes concentrações e tempos de exposição testados. Concentrações que causaram 100% de mortalidade ou nenhuma mortalidade foram excluídas dos resultados. Mortalidade de embriões de zebrafish expostos a etilenoglicol em temperatura ambiente. **A** – 24 hpf **B** - 48 hpf **C** - 72 hpf **D** – 96 hpf

Em temperatura ambiente e resfriada concentrações acima de 6,25% causaram mortalidade total dos embriões nas primeiras 24 horas. Com 3,12% de glicerol, os embriões em temperatura resfriada resistiram mais do que os em temperatura ambiente durante as primeiras 24 horas, indicando a ação crioprotetora. Na concentração 0,02% a mortalidade foi maior em temperatura resfriada, dessa forma pouca quantidade de crioprotetor pode não ter protegido o embrião dos danos provocados pela diminuição da temperatura.

Dentro da taxa de mortalidade das 24 horas, a fase em que os embriões foram mais sensíveis foi durante a blástula. Com a porcentagem acumulativa da mortalidade, nas concentrações acima de 3,12% mais da metade dos embriões mortos nas primeiras 24 horas, já estavam mortos durante a fase de fechamento de blastoporo (Figura 17).

A taxa de mortalidade por exposição de glicerol em temperatura ambiente foi menor com 96 hpf, indicando que o embrião mais desenvolvimento é mais resistente ao crioprotetor (Figura 18). A comparação entre a taxa de mortalidade e o período de desenvolvimento indicou diferença significativa apenas no período entre 24 a 48 hpf (Quadro 10).

Em temperatura resfriada os valores de mortalidade embrionário em relação ao tempo variou, principalmente entre os períodos de 48 a 72 hpf (Figura 17). Os valores de taxa de mortalidade em relação ao tempo de exposição mostraram diferenças significativas apenas no momento de 24 a 48 hpf em todas as concentrações (Quadro 10). A concentração de 12,5% e 6,25% parecem ter efeito crioprotetor mais interessante para pequenos tempos de exposição por causarem mortalidade menor ou semelhante em temperatura resfriada.

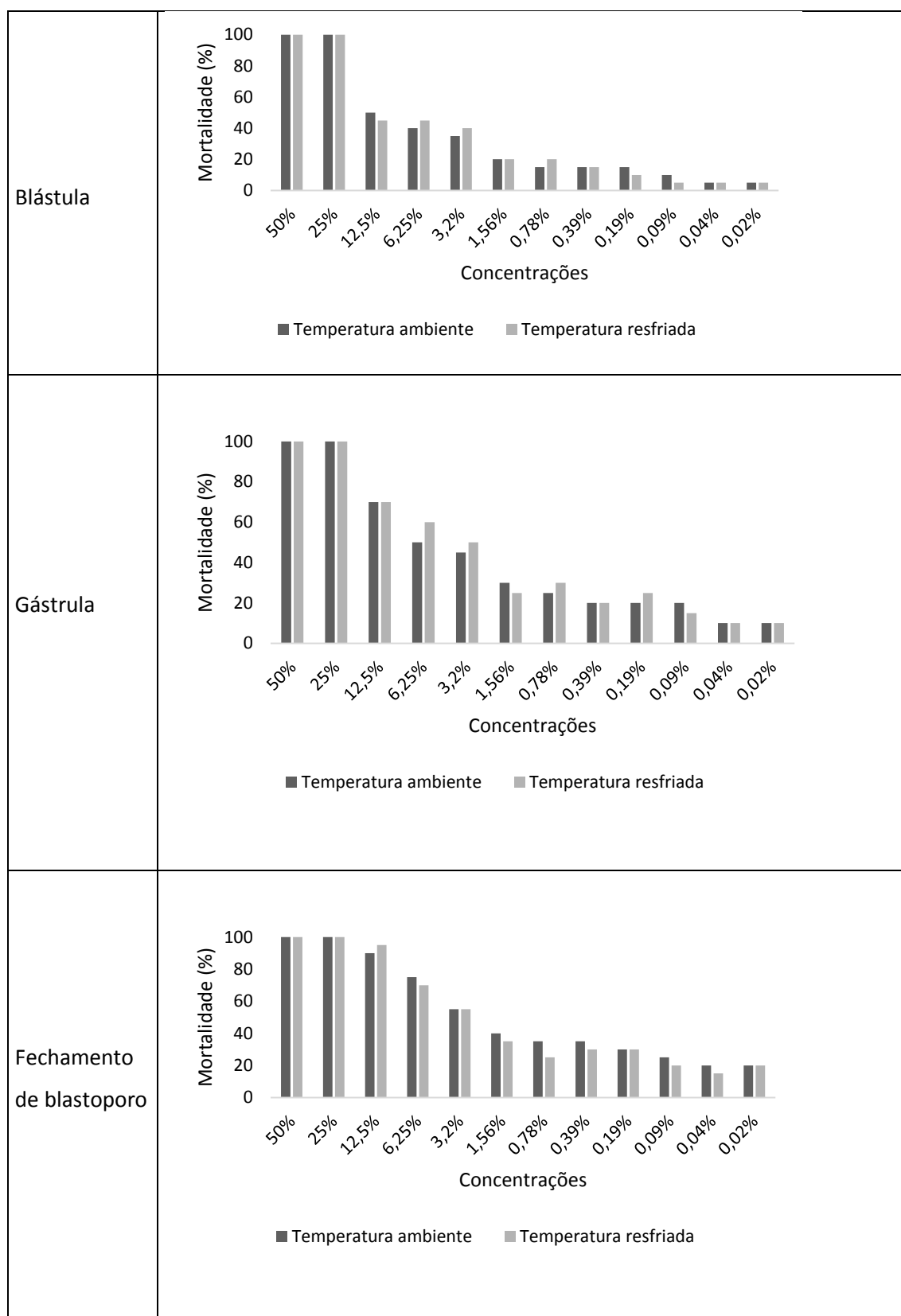


Figura 17. Taxa de mortalidade em diferentes fases de desenvolvimento de embriões expostos a glicerol em temperatura ambiente e resfriada.

Embriões expostos durante 24 horas ao etilenoglicol apresentam maiores taxas de mortalidade. Que diminuem ao longo das 96 horas de exposição. A concentração de 3,12% promove alta mortalidade com 24 horas de exposição, porém conforme o tempo de exposição aumenta em temperatura resfriada ela apresenta mortalidade menor em relação aos embriões na mesma concentração em temperatura ambiente. A concentração de 0,02% com 96 horas causa maiores taxas de mortalidade em temperatura resfriada, o que indica diminuição da capacidade crioprotetora em baixas concentrações.

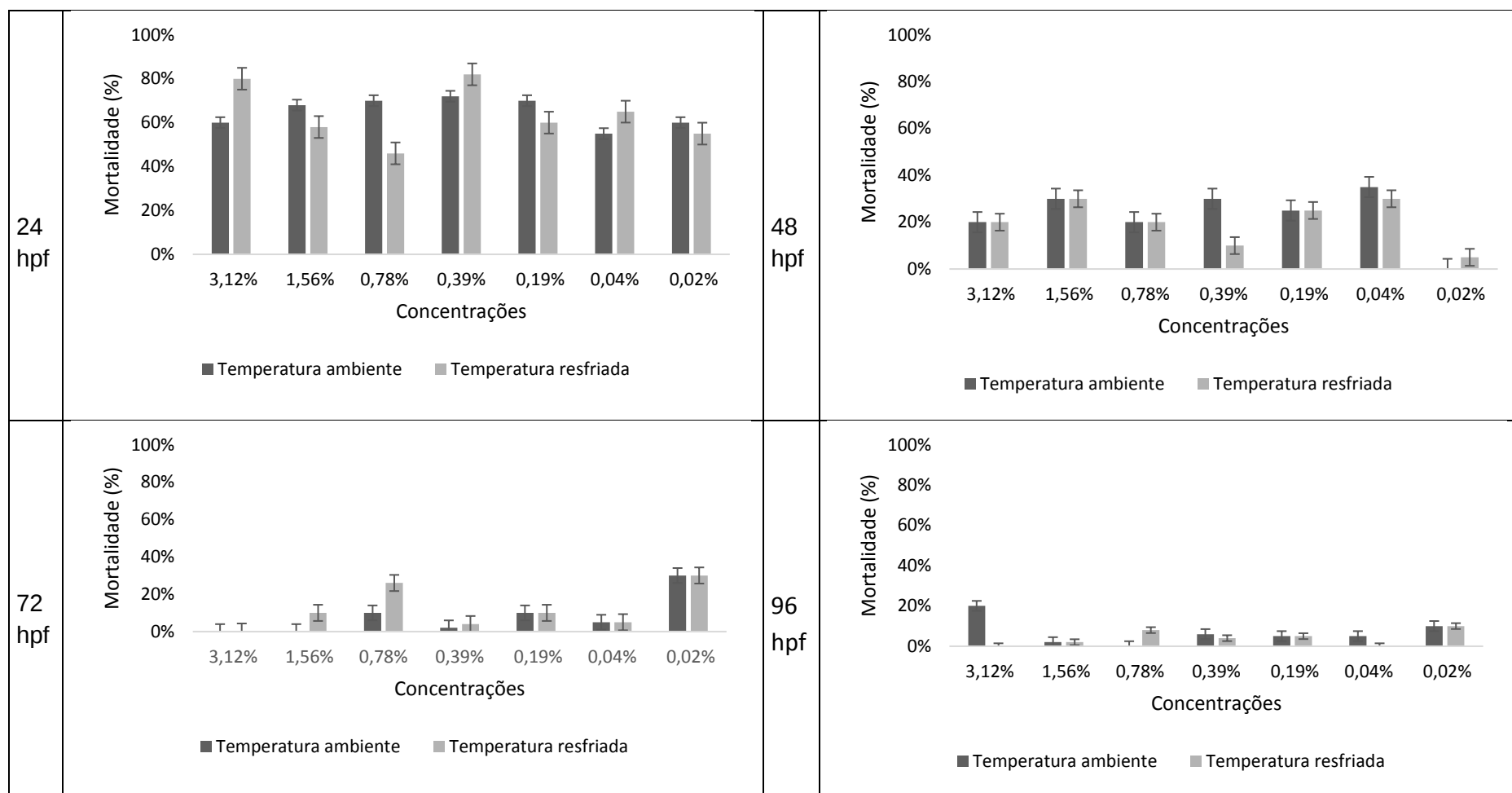


Figura 18. Taxa de mortalidade pelo tempo de exposição ao glicerol em temperatura ambiente e resfriado

Os tempos de exposição de 24-48 horas apresentaram diferença significativa para as concentrações 0,78%, 0,39% e 0,19%, sendo que a taxa de mortalidade foi menor para a concentração de 0,78% e 0,19%. Para temperatura resfriada houve diferença significativa para os tempos de exposição 24-48 horas para a concentração 3,12%, 0,78%, 0,19%; sendo que a primeira concentração causa maior taxa de mortalidade.

Quadro 10. Valores de p, indicando se existe diferença significativa entre as mortalidades por tempo de exposição a glicerol em temperatura ambiente e resfriada.

	Temperatura ambiente			Temperatura resfriada		
	24 - 48	48 – 72	72 - 76	24 - 48	48 - 72	72 -96
3,12%	0,046	0,421	0,437	0,004	0,102	1
1,56%	0,05	0,053	0,977	0,057	0,167	0,328
0,78%	0,008	0,439	0,846	0,076	0,720	0,592
0,39%	0,034	0,059	1	0,217	0,592	1
0,19%	0,043	0,196	0,808	0,002	0,246	0,318
0,09%	0,05	0,104	0,265	0,058	0,329	0,295
0,04%	0,005	0,135	1	0,05	0,075	0,839
0,02%	0,05	0,567	0,230	0,005	0,107	0,337

As taxas de mortalidade de embriões expostos a glicerol em temperatura ambiente e resfriada foram significativamente diferentes da taxa do controle

negativo apenas em concentrações acima de 0,39%. A chance de sobrevivência em relação ao controle da concentração 0,02% foi menor na temperatura resfriado do que a ambiente (Quadro 11).

Quadro 11. Valores de mortalidade (%), p e old ration para cada concentração de glicerol após as 96 horas de exposição em temperatura ambiente e resfriada.

	Temperatura ambiente			Temperatura resfriada		
	Mortalidade (%)	Valor de p	Odds ration	Mortalidade (%)	Valor de p	Odds ration
3,12%	75	< 0,0001	0,022	35	< 0,0001	0,054
1,56%	30	0,0051	0,158	35	< 0,0001	0,054
0,78%	10	< 0,0001	0,600	45	< 0,0001	0,043
0,39%	0	0,724	8	25	0,020	0,478
0,19%	20	0,430	0,2667	20	0,724	0,678
0,09%	10	0,5655	0,600	20	0,005	0,678
0,04%	10	0,5655	0,600	12	0,1356	0,845
0,02%	15	0,2205	0,210	15	0,220	0,718

Ao verificar o percentual da taxa de mortalidade em temperatura ambiente e resfriada mostra que a concentração de 50% a 6,25% não apresenta

diferenças significativas, isso ocorre também na concentração de 1,56% (Quadro 12). Sendo que as diferenças sempre apontam para menor taxa de mortalidade em temperatura resfriada.

Quadro 12: Comparação entre a taxa percentual de mortalidade das concentrações de glicerol em diferentes ambientes e o valor de p.

	Temperatura ambiente	Temperatura resfriada	p
50	100	100	0,4789
25	100	100	0,7641
12.5	100	100	0,6198
6.25	100	100	0,1607
3.2	50	35	< 0.0001
1.56	30	35	0,0003
0.78	25	45	< 0.0001
0.39	25	23	0,1290
0.19	20	19	0,1290
0.09	15	27	< 0.0001
0.04	15	1	< 0.0001
0.02	10	15	0,0003

5.5 Alterações teratogênicas provocados por crioprotetores

As alterações provocadas por crioprotetores foram edemas de pericardio e saco vitelino, alteração de coluna vertebral e retardo de eclosão (Tabela 1 e 2).

O retardo de eclosão foi maior em exposição com temperatura resfriada, exceto para o etilenoglicol, que teve taxa maior em temperatura ambiente. Edemas de pericárdio foram encontrados em maior percentual em crioprotetores que continham álcool na composição, no caso metanol e etilenoglicol. Não foram encontradas diferenças significativas entre as alterações teratogênicas em temperatura resfriada ou ambiente. Porém é possível observar que a diminuição da temperatura reduz alguns tipos de teratogênias como edema de pericárdio e de saco vitelino, para alguns crioprotetores.

Ao comparar a taxa de alterações entre o grupo controle e experimental, observa-se que em temperatura ambiente o etilenoglicol foi o maior responsável pelas teratogênias com valor de $p = 0,05$, e em temperatura resfriada o crioprotetor que mais causou alterações foi o glicerol (Quadro 13).

Tabela 1. Alterações teratogênicas provocadas por crioprotetores em temperatura ambiente

	Metanol	DMSO	Etilenoglicol	Glicerol
Edema de pericárdio	12,0 %	1,45 %	13,11%	6%
Edema de saco vitelino	4,11%	1,54%	10,6%	3%
Alteração de coluna	0,83%	2,60%	9,23%	6%
Retardo de eclosão	5 %	6,45 %	16,21%	3%

Tabela 2. Alterações teratogênicas provocadas por crioprotetores em temperatura resfriada

	Metanol	DMSO	Etilenoglicol	Glicerol
Edema de pericárdio	7,0 %	6 %	15%	5%
Edema de saco vitelino	6,2%	12%	13%	22%
Alteração de coluna	2%	3%	3%	-
Retardo de eclosão	15 %	8%	8%	8%

Quadro 13: Valor de p ao comparar a taxa de teratogênica do grupo controle com o grupo experimental, em temperatura ambiente e resfriada.

	Temperatura ambiente				Temperatura resfriada			
	DMSO	Met	Etileno	Glic	DMSO	Met	Etileno	Glic
Edema de pericardio	0,845	0,059	0,05	0,078	0,167	0,089	0,046	0,030
Edema de saco vitelino	0,643	0,967	0,05	0,743	0,098	0,069	0,056	0,045
Alteração de coluna	1,256	0,952	0,068	0,079	0,518	0,500	0,568	1,398
Retardo de eclosão	0,317	0,218	0,05	0,098	0,054	0,346	0,395	0,338

6. DISCUSSÃO

Comparando os resultados de mortalidade do metanol nas duas temperaturas, é possível verificar que a taxa de mortalidade caiu no grupo resfriado. A criopreservação de embriões de cascudo foi melhor utilizando o crioprotetor metanol com adição de sacarose como crioprotetor externo, dessa forma a união dos dois crioprotetores aumentaria a proteção já existente do metanol durante o resfriamento (FORNANI et al., 2014). Esse trabalho corrobora os resultados encontrados que indicam que o metanol mostrou proteger o embrião, nas concentrações de 1,56% à 0,39% dos danos causados pela diminuição da temperatura, uma vez que a taxa de mortalidade do controle se mostrou maior nestas concentrações.

A taxa de mortalidade em embriões resfriados foi de 100% em concentrações acima de 3,12%, em concentrações mais baixas houve sobrevivência e eclosão dos embriões. AHAMMAD et al. (2003) testando a toxicidade de metanol em embriões de *Cyprinus carpio* em temperatura de 8 °C encontrou que em concentrações abaixo de 2,5% de metanol havia uma boa taxa de eclosão, a eclosão não ocorreu em embriões expostos a concentrações acima de 3,5%.

Em comparação com a temperatura ambiente, a resfriada levou a um aumento da mortalidade do grupo controle e a diminuição no grupo experimental, o mesmo fato foi encontrado por ZHANG et al. (2003), onde adição de metanol ao meio embrionário aumentou significativamente a sobrevivência dos embriões para todos estágios de desenvolvimento embrionário e em todas as taxas de resfriamento quando comparado com controles.

Em temperatura ambiente a morte embrionária foi total em concentrações acima de 3,12% de metanol. Utilizando embriões de *Scophthalmus maximus* expostos a 5% de metanol em temperatura ambiente por 30 minutos, Cabrita et al. (2003) observou eclosão dos embriões. Porém em tal estudo o embrião foi adicionado com estágio de desenvolvimento entre 72 e 96 hpf, ao contrário do que foi realizado neste, no qual a exposição embrionária iniciou-se em fase de alto.

As primeiras 24 horas de desenvolvimento se mostraram mais sensíveis para a exposição de metanol. Em fase de blástula as concentrações mais altas apresentaram-se muito tóxicas, mantendo 100% dos embriões independente da temperatura. URBANYI et al. (1997) utilizando embriões de carpa expostos a metanol 1 M por uma hora em temperatura ambiente perceberam que estes eram mais resistentes a mortalidade em estágios avançados, no qual era possível observar batimentos cardíacos. Também foi observado que os embriões se mostram mais sensíveis nos momentos iniciais de divisão e diferenciação celular.

Ao final das 96 horas de exposição o metanol levou a uma maior mortalidade final. Alguns estudos já mostraram que a toxicidade do crioprotetor pode estar relacionada ao tempo de exposição do embrião ao composto. Estes dados podem ser corroborados por (ZHANG et al., 2003) que utilizando o metanol, em diferentes estágios embrionários de zebrafish, demonstraram que houve uma maior mortalidade quando estes eram submetidos ao resfriamento lento. Isso indica que quanto maior o tempo exposto ao metanol em temperaturas acima de 0°C, maior a mortalidade dos embriões.

O DMSO apresentou uma taxa percentual de mortalidade baixa em relação aos outros crioprotetores testados. A toxicidade sistêmica do DMSO é considerada baixa em comparação aos crioprotetores com álcool (etilenoglicol e metanol), sua combinação com outros agentes tóxicos é o que aumentam seu potencial tóxico (BRAYTON, 1986).

O DMSO promoveu baixa mortalidade em temperatura ambiente, porém concentrações acima de 3,12% promoveram 100% de mortalidade. Dessa forma o indicado para a tentativa de criopreservação seriam as concentrações abaixo de 1,56%. Estudos testando a toxicidade do DMSO também foram realizados com embriões de *Sparus aurata* em temperatura ambiente, e os resultados indicaram que em concentrações acima de 4 %, o efeito tóxico do composto era bem evidente (CABRITA et al., 2006). Dessa forma o indicado para a tentativa de criopreservação seriam as concentrações abaixo de 1,56%.

Tanto em temperatura resfriada como em temperatura ambiente a taxa de mortalidade foi total quando os embriões foram expostos a concentrações acima

de 3,12% de DMSO. KAIS et al. (2013) utilizando embriões de zebrafish após fertilização em temperatura ambiente, demonstrou por fluorescência que quanto maior a concentração de DMSO, maior o dano causado ao coriön do embrião. Tal resultado é devido oxidação do tiol e da peroxidação lipídica, que leva também a um aumento da permeabilidade do coriön e consequentemente maior penetração do crioprotetor.

Apesar de em temperatura ambiente o metanol ser mais toxico que o DMSO, em temperatura resfriada ele pareceu proteger mais o embrião. No estudo de ZHANG et al. (2007) utilizando embriões de zebrafish expostos a diversas concentrações de metanol e DMSO em – 30 °C e em temperatura ambiente avaliando blástula, gástrula e período pré-eclosão, verificaram que o efeito do metanol em meio resfriado foi mais protetor do que o DMSO e em temperatura ambiente tiveram efeitos parecidos.

Nossos resultados demonstram que embriões em fase inicial de desenvolvimento (24 horas) quando expostos ao DMSO apresentam maior mortalidade do que quando expostos ao metanol. (HARGERDON et al., 1997) demonstrou que estágios iniciais de embriões de peixes teleósteos, de até 64 células são mais sensíveis a efeitos externos, uma vez que o processo de diferenciação celular poderia ser afetado. Sabe-se que derivados de álcool têm tropismo por células do sistema nervoso central. Nas fases iniciais ainda não ocorreu diferenciação de células deste sistema, o que poderia estar relacionado com a menor toxicidade do metanol em embriões no desenvolvimento inicial, quando comparados ao DMSO.

O DMSO promoveu altas taxas de mortalidade tanto em temperatura ambiente como em temperatura resfriada, principalmente em altas concentrações e no início do desenvolvimento. SUZUKI et al., (1995) demonstrou que o fator da penetração pode alterar a toxicidade. Realizando estudos com embriões de tutra arco íris e carpa expostos a metanol 2M em temperatura ambiente houve uma variação da velocidade da penetração, devido a diferenças de gradiente de concentração, ou seja, quanto maior a concentração de crioprotetor no meio externo, maior a velocidade de penetração deste. Assim é provável que nos primeiros momentos de exposição ao DMSO,

a penetração seja mais rápida, pois ainda não há DMSO no interior do embrião, o que levaria a um aumento das taxas de mortalidade.

Em concentrações acima de 6,25% o glicerol provocou morte embrionária total tanto em temperatura ambiente como resfriada. Assim como os outros crioprotetores o glicerol provocou maior taxa de mortalidade nas primeiras 24 de exposição. DINNEYS et al. (1998) testando glicerol em temperatura ambiente em embriões de *Cyprinus carpio* encontrou que no estágio de mórula grande parte dos embriões não sobreviviam a exposição durante 5 minutos.

Em temperatura ambiente a taxa de mortalidade do glicerol diminuiu quando em concentrações abaixo de 3,12%. Embriões de *Paralichthys olivaceus* expostos a concentrações acima de 10% de glicerol em temperatura ambiente apresentaram baixa taxa de sobrevivência e danos morfológicos ao embrião. Porém quando exposto em -15°C, a concentração de 10% foi o ideal para proteger o embrião do frio (ZHANG et al. 2005). Em temperatura resfriada encontramos sobrevivência somente abaixo de 3,12%, a diferença é que os autores anteriores utilizaram resfriamento rápido e com uma temperatura muito menor, dessa forma o embrião ficou menos tempo exposto ao crioprotetor.

A taxa de mortalidade de embriões expostos a glicerol nas duas temperaturas diminuiu conforme o desenvolvimento embrionário evoluía. VUTHIPHANDCHAI et al. (2005) utilizando embriões de *Penaeus monodon* em testes com concentrações de glicerol de 5 á 20% por até 150 minutos de exposição com temperatura variando de 6 a 26 °C, indicou maior mortalidade nos primeiros estágios de desenvolvimento mesmo nas concentrações mais baixas. Tal resultado tem relação com a regulação da osmose, diminuindo assim a permeabilidade ao crioprotetor.

Alterações teratogênicas foram avaliadas, em todos os crioprotetores, tanto em temperatura ambiente como em resfriada e foram encontradas mais frequentemente edema de pericárdio, edema de saco vitelino, alteração de coluna vertebral e houve retardo na eclosão dos embriões. Utilizando embriões de salmão (*Oncorhynchus keta*) após 30 minutos de exposição foram observadas teratogênias relacionadas com alteração do desenvolvimento de pericárdio, bem como a redução do tamanho dos blastômeros, estas

concentrações estavam acima de 6,25% de metano, DMSO e glicerol (KUSUDA; TERANISH, 2002).

Ao observar as alterações teratogências provocadas nos embriões pela exposição ao metanol e ao etilenoglicol podemos identificar mau formações de olho, indicando atuação no sistema nervoso e alterações de pericárdio (JAFF et al. 2014).

Mesmo apresentando menor toxicidade, o DMSO provocou algumas alterações teratogênicas, como edema de saco vitelino. Os mesmos resultados foram encontrados em testes de toxicidade realizados em temperatura ambiente com embriões de zebrafish, que mostraram que o DMSO é o crioprotetor interno de menor toxicidade (LANSTERINER, 2008) corroborando os resultados do presente trabalho.

7. CONCLUSÃO

Podemos concluir que a toxicidade dos crioprotetores diminui em ambientes resfriados. Os crioprotetores que apresentaram menor taxa de mortalidade foram glicerol e DMSO em temperatura ambiente.

Em temperatura resfriada o crioprotetor que apresentou maior proteção para os embriões durante a queda da temperatura foi o metanol. Porém em temperatura ambiente este crioprotetor foi o que causou maior taxa de mortalidade em concentrações abaixo de 3,12%. A concentração para esse resfriamento seria entre 1,56% a 0,39%, em concentrações acima disso a mortalidade é maior pela toxicidade e abaixo desse valor o metanol não provoca efeito protetivo.

Em temperatura ambiente o DMSO apresentou menos toxicidade se comparado a temperatura resfriada. Em temperatura resfriada o DMSO mostrou apresentar baixo efeito protetivo para os embriões.

O glicerol tanto em temperatura ambiente como em resfriada apresentou ter menor toxicidade se comparado aos outros. Em temperatura resfriada ele apresentou efeito protetivo, uma vez que sua chance de sobrevivência embrionária era maior do que em temperatura ambiente.

Para criopreservação em embriões de peixes os crioprotetores mais indicados forma aqueles a base de álcool, metanol e etilenoglicol, eles apresentaram maior efeito protetivo durante o resfriamento.

A fase mais indicada para criopreservação aparenta depender do método de criopreservação, para um congelamento lento a fase ideal seria o estágio de gástrula ou fechamento de blastóporo, pois nessas fases o embrião mostra se um pouco mais resistente a toxicidade do crioprotetor, já para vitrificação o aconselhável seria blástula, uma vez que o tempo de exposição ao crioprotetor será menor.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

A criopreservação de embriões permitiria a manutenção de estoques genéticos o que promoveria conservação de muitas espécies em extinção assim como armazenamento de genéticas interessantes a criadores tanto de peixes ornamentais como de peixes de produção. Esta biotécnica também facilitaria a produção de peixes para o comércio durante todo ano e não somente em período de piracema, melhorando assim o mercado dessa área de produção.

Atingir a eficiência de tal técnica será relativamente importante para o ecossistema também, uma vez que esses embriões produzidos na maioria das vezes serão destinados ao consumo, diminuindo assim a necessidade de matança exagerado desses peixes livres no meio ambiente, aumentando assim a preservação de algumas espécies.

A partir do nosso estudo indica se a utilização de metanol para tentativa de criopreservação de peixes. Para melhores resultados para um procedimento de criopreservação estudos sobre as moléculas de aderência e sua relação na criopreservação poderiam ser realizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, S., PELELLIZER, C., PAPARELLA, M., HARTUNG, T., & BREMER, S.. The effects of solvents on embryonic stem cell differentiation. **Toxicology in vitro**, v. 20, n. 3, p. 265-271, 2006.

AHAMMAD, M. M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B. B. Hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos stored at 4 and -2° C in different concentrations of methanol and sucrose. **Theriogenology**, v. 60, n. 8, p. 1409-1422, 2003.

AL-AZAWI, T. et al. Cryopreservation of human oocytes, zygotes, embryos and blastocysts: A comparison study between slow freezing and ultra rapid (vitrification) methods. **Middle East Fertility Society Journal**, v. 18, n. 4, p. 223–232, 2013.

ALMINANA, C.; CUELLO, C. What is new in the cryopreservation of embryos. **Anim. Reprod**, v. 12, n. 3, p. 418-427, 2015.

ARAV, A. Cryopreservation of oocytes and embryos. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 96-102, 2014.

ARAUJO-MONTEIRO, Júlia Trugilio Lopes; LEITE-CASTRO, Liliane Vera. Dose inseminante e resfriamento de embriões de peixes de água doce. *Rev. Bras. Reprod. Anim*, v. 40, n. 1, p. 35-40, 2016

ARGYLE, C. E.; HARPER, J. C.; DAVIES, M. C. Oocyte cryopreservation: Where are we now? **Human Reproduction Update**, v. 22, n. 4, p. 440–449, 2016.

BELANGER, Scott E.; RAWLINGS, Jane M.; CARR, Gregory J. Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 32, n. 8, p. 1768-1783, 2013.

BEEKHUIJZE, M., de Koning, C., Flores-Guillén, M. E., de Vries-Buitenweg, S., Tobor-Kaplon, M., van de Waart, B., & Emmen, H. From cutting edge to guideline: a first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. **Reproductive Toxicology**, v. 56, p. 64-76, 2015.

BIELANSKI, A.; HARE, W. C. D. Survival in vitro of bovine demi-embryos after freezing by slow cooling rates or vitrification. **Theriogenology**, v. 29, n. 1, p. 223, 1988.

BOONKUSOL, Duangjai et al. Gene expression profiles and in vitro development following vitrification of pronuclear and 8-cell stage mouse embryos. **Molecular reproduction and development**, v. 73, n. 6, p. 700-708, 2006.

BRANBECK, T., KAIS, B., LAMMER, E., OTTE, J., SCHONNEIDER, K., STENGEL, D., & STECKER, R. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 21, p. 16247-16261, 2015.

BRAYTON, C. F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. **The Cornell Veterinarian**, v 76, n.1, p. 61-90, 1986.

CABRITA, E., ROBLES, V., CHEREGUINI, O., WALLACE, J. C., & HERRAEZ, M. P Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). **Cryobiology**, v. 47, n. 3, p. 204-213, 2003.

CABRITA, E., Robles, V., Wallace, J. C., Sarasquete, M. C., & Herráez, M. P. Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. **Aquaculture**, v. 251 n. 2-4, p. 245-255, 2006.

CALVI, S. L.; MAISSE, G. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blastomeres influence of embryos (*Scophthalmus maximus*). **Cryobiology**, v. 36, p. 255–262, 1998.

CHAO, N. H.; LIAO, I. C. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. **Aquaculture**, v.197, p.161-189, 2001.

CHEN, S. L.; TIAN, Y. S. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. **Theriogenology**, v. 63, n. 4, p. 1207-1219, 2005.

CORTÊS, PCG; RODRIGUES, J. L. Sobrevivência de blastocistos *Mus domesticus domesticus* vitrificados em meio contendo 9, 0 M de etilenoglicol na presença de sacarose. **Ciência Rural**, v. 30, n. 3, p. 461-467, 2000.

DODE, M. A N.; LEME, L. O.; SPRÍCIGO, J. F. W. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p. 145–150, 2013.

DINNYES, A., URBANYI, B., BARANYAI, B., & MAGYARY, 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, n. 1, p. 1-13, 1998.

FORMARI, D. C., RIBEIRO, R. P., STREIT, D., GODOY, L. C., NEVES, P. R., de OLIVEIRA, D., & SIROL, R. N. Effect of cryoprotectants on the survival of cascudo preto (*Rhinelepis aspera*) embryos stored at -8 C. **Zygote**, v. 22, n. 1, p. 58-63, 2014

JACOB, S. W.; HERSCHLER, R. Introductory remarks: dimethylsulfoxide after twenty years. **Annals of Academy Science of the New York**, New York, v. 401, p. 13-17, 1983.

JAFF, Z., MCINTYRE, W. F., YAZDAN-ASHOORI, P.; BARANCHUK, A.. Impact of methanol intoxication on the human electrocardiogram. **Cardiology journal**, v.21 n.2, p.170-175, 2014.

JANG, Tae Hoon et al. Cryopreservation and its clinical applications. **Integrative Medicine Research**, v. 6, n. 1, p. 12, 2017.

HAGEDORN, M. et al. New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation. **Cryobiology**, v. 34, n. 4, p. 335-347, 1997.

HAGEDORN, M. et al. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option. **Cryobiology**, v. 49, n. 2, p. 181-189, 2004.

HAMMERSTED, R. H.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. **Cryobiology**, San Diego, v. 29, n. 1, p. 26-28, 1992.

HERRID, M.; VAJTA, G.; SKIDMORE, J. A. Current status and future direction of cryopreservation of camelid embryos. **Theriogenology**, v. 89, p. 20-25, 2017.

HOO, J. Y., Kumari, Y., Shaikh, M. F., Hue, S. M., & Goh, B. H. Zebrafish: a versatile animal model for fertility research. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.

Kais, B., SCHNEIDER, K. E., KEITER, S., HENN, K., ACKERMANN, C., & BRAUNBECK, T. DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Danio rerio*) chorion-implications for the fish embryo test (FET). **Aquatic toxicology**, v. 140, p. 229-238, 2013.

KIMMEL, C. B., BALLARD, W. W., KIMMEL, S. R., Ullmann, B. & Schilling, T. F. (1995) Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. **DevelopmentalDynamics**,203, 255-310.

KNOBEL, M., BUSSER, F. J., RICO-RICO, A., KRAMER, N. I., HERMENS, J. L., HAFNER, C., ... & SCHOLZ, S. Predicting adult fish acute lethality with the

zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. **Environmental science & technology**, v. 46, n. 17, p. 9690-9700, 2012.

KIM, D. H., SUN, Y., YUN, S., KIM, B., HWANG, C. N., LEE, S. H., & NELSON, B. J. Mechanical property characterization of the zebrafish embryo chorion. In: **Engineering in Medicine and Biology Society, 2004. IEMBS'04. 26th Annual International Conference of the IEEE**. IEEE, 2004. p. 5061-5064.

KUSUDA, Satoshi; TERANISHI, Tetsuo; KOIDE, Nobuhisa. Cryopreservation of chum salmon blastomeres by the straw method. **Cryobiology**, v. 45, n. 1, p. 60-67, 2002.

LAHNSTEINER, F. The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, v.69, p.384-396, 2008

LAWRENCE, Christian. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. **Aquaculture**, v. 269, n. 1-4, p. 1-20, 2007.

LEIBO, S. P.; POOL, Thomas B. The principal variables of cryopreservation: solutions, temperatures, and rate changes. **Fertility and sterility**, v. 96, n. 2, p. 269-276, 2011.

LEUNG, L. K. Live preservation of fish gametes. *Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa*, p. 245-269, 1991.

LI, J., ZHANG, L. L., LIU, Q. H., XU, X. Z., XIAO, Z. Z., MA, D. Y., XU, S. H., XUE, Q. Z. Extra- and intra-cellular ice formation of red seabream (*Pagrus major*) embryos at different cooling rates. **Cryobiology** v. 59, p. 48-53, 2009.

MANDAWALA, A. A., Harvey, S. C., Roy, T. K., & Fowler, K. E. Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. *Theriogenology*, v. 86, n. 7, p. 1637-1644, 2016.

MASSIP, Alban. Cryopreservation of embryos of farm animals. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, n. 2, p. 49-55, 2001.

MERYMAN, H. T.; WILLIAMS, R. T.; DOUGLAS, M. S. J. Freezing injury from "solution effect" and its prevention by natural or artificial cryoprotectant. **Cryobiology**. v.14, p.287-302, 1977.

PAULA, D. A., Machado, M. R., Murgas, L. D., Rabelo, D., Zangerônimo, M. G., VR Neto, R., ... & Andrade, E. A. Toxicity of cryoprotectants on *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837)(curimba) embryos in an experimental incubator

(Characiformes: Prochilodontidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 12, n. 4, p. 835-844, 2014.

ROBLES, V., CABRITA, E., FLETCHER, G. L., SHEARS, M. A., KING, M. J., & HERRAEZ, M. P. Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species. **Theriogenology**, v. 64, n. 7, p. 1633-1646, 2005.

ROSENBAUM, E. E., HERSCHILER, R. J., JACOB, S. W. Dimethyl sulfoxide in musculoskeletal disorders. **Journal American Medical Association**, Chicago, v. 192, n. 4, p. 309-313, 1965.

SCHNEIDER, A. C. R. et al. Implementation of a New Experimental Animal Model - Zebrafish. **Revista HCPA**, v. 29, n. 2, p. 100–103, 2009

STRAHLE, U., SCHOLZ, S., GEISLER, R., GREINER, P., HOLLERT, H., RASTEGAR, S., ... & BRAUNBECK, T. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments—a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. **Reproductive Toxicology**, v. 33, n. 2, p. 128-132, 2012.

STREIT, D. P.; DIGMAYER, M.; RIBEIRO, R. P.; SIROL, R. N.; MORAES, G. V. e GALO, J. M. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1119-1202, 2007.

SUZUKI, T., Komada, H., Takai, R., Aii, K., & Kozima, T. T. Relation between toxicity of cryoprotectant DMSO and its concentration in several fish embryos. **Fisheries science**, v. 61 n. 2, p. 193-197, 1995.

TAKAGI, M.; BOEDIONO, A.; SAHA, S.; SUZUKI, T. Survival rate of frozen-thawed bovine IVF embryos in relation to exposure time using various cryoprotectants. **Cryobiology**, San Diego, v. 30, n. 5, p. 306-312, Oct. 1993.

VIEIRA, S., DE ANDRADE, A., GOMES, C. M., ROCHA, L., DE FIGUEIREDO, J. R., & RIBEIRO, A. P. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, 2011.

VUTHIPHANDCHAI, Verapong; PENGUN, Boonprasert; NIMRAT, Subuntith. Effects of cryoprotectant toxicity and temperature sensitivity on the embryos of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture**, v. 246, n. 1-4, p. 275-284, 2005.

URBANYI, B., BARANYAI, B., MAGYARY, I., & DINNYES, A. Toxicity of methanol, DMSO and glycerol on carp (*Cyprinus carpio*) embryos in different developmental stages. **Theriogenology**, v. 1, n. 47, p. 408, 1997.

WAKCHAURE, Rajesh et al. A Review on Cryopreservation of Embryos and its Research Implications in Animal Breeding and Reproduction. **Int. J. Phar. & Biomed. Rese**, v. 2, n. 5, p. 11-16, 2015.

WESTERFIELD, Monte. The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish. http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html, 2000.

ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Studies on Chilling Sensitivity of Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Embryos. **Cryobiology**, v. 32, n. 3, p. 239–246, 1995.

ZHANG, T.; RAWSON, D. M.; PEKARSKY, I.; BLAIS, I.; LUBZENS, E. Low temperature preservation of fish gonad cells and oocytes. In: BADIN, P. J.; CERDÀ, J. e LUBZENS, E. The fish oocytes: from basic studies to biotechnological applications. **Springer**, 2007. p.411-436.

ZHANG, T.; LIU, X. H.; RAWSON, D. M. Effects of methanol and developmental arrest on chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, v. 59, n. 7, p. 1545–1556, 2003.

ZHANG, Y. Z., ZHANG, S. C., LIU, X. Z., XU, Y. J., HU, J. H., XU, Y. Y., ... & Chen, S. L. Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. **Theriogenology**, v. 63, n. 3, p. 763-773, 2005

ZHANG, Q. J., ZHOU, G. B., WANG, Y. P., FU, X. W., & ZHU, S. E. Cryoprotectants protect medaka (*Oryzias latipes*) embryos from chilling injury. **CryoLetters**, v. 33, n. 2, p. 107-116, 2012.

ZHAO, Gang; FU, Jianping. Microfluidics for cryopreservation. **Biotechnology Advances**, 2017.