

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
CURSO DE ZOOTECNIA**

TALES FABRIS CHAVES

**PROTOCOLO PARA RESFRIAMENTO DE EMBRIÕES DE ZEBRAFISH
DURANTE ATÉ 12 HORAS**

Porto Alegre

2023

TALES FABRIS CHAVES

**PROTOCOLO PARA RESFRIAMENTO DE EMBRIÕES DE ZEBRAFISH
DURANTE ATÉ 12 HORAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Danilo Pedro S. Jr.

Coorientadora: Dra. Lis Marques

Porto Alegre

2023

TALES FABRIS CHAVES

**PROTOCOLO PARA RESFRIAMENTO DE EMBRIÕES DE ZEBRAFISH
DURANTE ATÉ 12 HORAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do
Grau em Bacharel em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do
Rio Grande do Sul

Data de aprovação: 28/08/2023

Danilo Pedro Streit Jr - Professor, Doutor

Orientador

Lis Marques – Professora, Doutora

Coorientador

Thaiza Rodrigues de Freitas – Doutoranda

Membro da Banca

Raquel Santos dos Santos - Doutoranda

Membro da Banca

AGRADECIMENTOS

Venho por meio desta carta registrar meus agradecimentos começando pela minha amada esposa: Nayara Oliveira da Cruz. Através do entendimento e empatia do tempo empregado a minha formação, à conciliação do dia a dia como esposa, companheira e orientadora. Sendo uma pessoa maravilhosa que divide tudo, amenizando os piores problemas em pequenas resoluções. Também recordo dos meus parentes – mãe, irmão, avô, tios... – que me apoiaram em tempos difíceis, onde a compreensão de amadurecimento vinha junto da frustração e impaciência de minha parte. Os verbos “trabalhar” e “estudar” quando colocados juntos na mesma frase, empregam o dobro de esforço, mas agradeço a Deus por me colocar à prova e testar minha capacidade. À Núria Fabris, dedico um momento especial para agradecer, sendo um exemplo de mulher e mãe, que na falta do auxílio de um pai em compromisso com seus filhos, e empregando o máximo de suas forças, conseguiu colocar comida à mesa e educar-nos para alcançar voos que outrora havia sonhado. Também recordo dos meus avós, Teresinha Rosalina de Souza Fabris e Sérgio Antônio Fabris, que auxiliaram na minha formação cidadão e sempre prestaram todo e qualquer suporte que necessitei nesta jornada. Minha avó sempre sonhou que conseguiria acompanhar minha formatura, guardou recursos para auxiliar durante a minha graduação, e infelizmente, através de uma doença grave não pode acompanhar-me. Sinto tanta sua falta, o pilar desta família. Sabendo que há alguém no céu orando pelo meu bem, deixo por último uma mensagem a ela: “Consegui, vó! Te amo”.

Agradeço a BAESA/ Fundação Luiz Englert pelo apoio à pesquisa através da bolsa de Iniciação Científica, podendo subsidiar o desenvolvimento. Aos meus amigos(as) e colegas de laboratório, que me incentivaram a fazer pesquisa e desafiar minha curiosidade, sempre auxiliando e orientando para meu crescimento, ficam meus carinhosos agradecimentos. Dentro destes 4 anos juntos, entraram e saíram pessoas que marcaram e fizeram parte da minha história. Agradeço ao meu orientador, Danilo Pedro Streit Jr., por abrir as portas e oferecer espaço onde eu consegui contribuir e deixar minha marca. Ao Laboratório AQUAM, deixo um “Muito Obrigado”, com um fraterno carinho e símbolo do tempo de desenvolvimento pessoal e profissional.

RESUMO

As técnicas de criopreservação e resfriamento de gametas e embriões têm atuado como importantes ferramentas na preservação de diversas espécies aquáticas, cuja necessidade de medidas que atendam suas condições específicas é crescente. Atualmente, diversos protocolos estão sendo testados na tentativa de elencar a melhor forma de conservação de embriões de peixes teleósteos. O transporte de material genético entre laboratórios e estabelecimentos contribuirá diretamente com as pesquisas, estabelecendo linhagens genéticas específicas e auxiliando na conservação de espécies. O Zebrafish (*Danio rerio*) é um modelo experimental muito utilizado, por ter transparência embrionária e facilitar análises e estudos por observação ocular, dando acesso a circulação e transporte de substâncias. O objetivo desse trabalho é otimizar um protocolo para resfriamento de embriões de zebrafish (*Danio rerio*), considerando aspectos como taxa de eclosão e comportamento larval, contribuindo com sua preservação, bem como o estudo do resfriamento em embriões de peixes e biotecnologias de transporte de embriões. Utilizando a proporção de 2 fêmeas para cada macho (2F:1M) a reprodução foi induzida, e os embriões coletados. Na condição de 50% de Epibolia (n=20) era feita a distribuição em três soluções (1M Metanol + 0,1M Sacarose, PBS e Água de Incubação), e controle, contendo 40 ml por Falcon em três tempos de resfriamento (6, 12 e 24 horas), posteriormente reaquecidos e incubados a $28,3^{\circ}\text{C} \pm 0,8$ em Placas Petri com 25 mL de água de incubação para as análises até da abertura de boca, onde foram avaliadas taxas de batimento cardíaco, taxa de eclosão e retardo. Em 96 horas pós-fecundação, as larvas eram levadas para aquários, para análises comportamentais, sobrevivência e deformidade, ficando nesta condição até o final do experimento em 15 dias pós-fecundação. O tratamento 1M Metanol + 0,1M Sacarose alcançou 12 horas de resfriamento com as mesmas taxas de eclosão que o controle. Porém, o tratamento com crioprotetor também revelou um aumento considerável no batimento cardíaco por minuto (bpm) dos embriões, o que reduziu o tempo de retardo causado pelo resfriamento. As taxas de deformidade e sobrevivência também revelaram que 1M Metanol + 0,1M Sacarose não possuem diferença estatística com o controle por até 12 horas de resfriamento. Os embriões mantidos por 24 horas de resfriamento não suportaram. O protocolo pode ser utilizado como peça fundamental para comercialização/ compartilhamento de linhagens genéticas específicas de Zebrafish, por até 12 horas, auxiliando na pesquisa farmacológica e avanço da pesquisa científica. O trabalho realizado abre portas para estudos que podem ser realizados visando produzir novas tecnologias para o transporte econômico e viável de embriões de peixes.

Palavras-chave: Metanol. Embriões de Peixe. Crioprotetor. Transporte

ABSTRACT

The techniques of cryopreservation and cooling of gametes and embryos have acted as important tools in the preservation of diverse aquatic species, whose need for measures that meet their specific conditions is increasingly increasing. Currently, manifold protocols are being tested in an attempt to list the best way to conserve teleost fish embryos. The transport of genetic material between laboratories and establishments will contribute directly to research, establishing specific genetic lineages and assisting in the conservation of species. The Zebrafish (*Danio rerio*) is a widely used experimental model, because it has embryonic transparency and facilitates analysis and studies by ocular observation, giving access to circulation and transport of substances. The objective of this work is to optimize a protocol for cooling zebrafish (*Danio rerio*) embryos, considering aspects such as hatching rate and larval behavior, contributing to its preservation, as well as the study of cooling in fish embryos and biotechnologies for embryos transport. Using the ratio of 2F:1M, reproduction was induced, and the embryos were collected. In the condition of 50% of Epibolia (n=20) was made the distribution in three solutions (1M Methanol + 0.1M Sucrose, PBS and Incubation Water), and control, containing 40ml by Falcon in three cooling times (6, 12 and 24 hours), later reheated and incubated at $28.3^{\circ}\text{C} \pm 0.8$ in Petri dishes with 25mL of incubation water for the analyses until the mouth opening, where heartbeat rates, hatch rate and delay were evaluated. In 96 hours after fertilization, the larvae were taken to aquariums for behavioral analysis, survival and deformity, remaining in this condition until the end of the experiment in 15 days post-fertilization. The 1M Methanol + 0.1M Sucrose treatment achieved 12 hours of cooling with the same hatch rates as the control. However, the treatment with cryoprotector also revealed a considerable increase in the heart rate per minute (bpm) of the embryos, which ended up reducing the delay time caused by cooling. The deformity and survival rates also revealed that 1M Methanol + 0.1M Sucrose have no statistical difference with the control for up to 12 hours of cooling. The embryos kept for 24 hours of cooling did not endure. The protocol can be used as a fundamental piece for commercialization / sharing of specific genetic strains of Zebrafish, for up to 12 hours, assisting in pharmacological research and advancement of scientific research. The work carried out opens the door to studies that can be carried out to produce new technologies for the economic and viable transport and embryos of fish.

Keywords: Metanol. Fish Embryos. Cryoprotectant. Transport

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01. Representação da morfologia embrionária de *Danio rerio*.

Figura 02. Delineamento experimental do trabalho realizado.

Figura 03. Taxa de Eclosão.

Figura 04. Taxa de Batimento Cardíaco por minuto.

Figura 05. Taxa de Deformidade.

Figura 06. Teratogênias demonstradas em PBS (C) e Água e Incubação (D).

Figura 07. Taxa de Sobrevivência.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1	A espécie em estudo.....	11
2.2	Desenvolvimento embrionário em peixes.....	12
2.3	Fases do desenvolvimento embrionário do zebrafish (Danio rerio).....	12
2.4	Resfriamento de embriões de peixes.....	15
2.4.1	Resfriamento de embriões de zebrafish.....	16
2.4.2	Características que dificultam o resfriamento de embriões de zebrafish.....	23
2.5	Danos causados por baixas temperaturas.....	24
2.6	Crioprotetores.....	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1	Local de Experimentação e Obtenção das Matrizes.....	26
3.2	Resumo do Delineamento Experimental.....	27
3.2.1	Reprodução.....	29
3.2.2	Cálculo Amostral.....	29
3.2.3	Desenvolvimento Embrionário.....	30
3.2.4	Reaquecimento e Análise.....	30
3.3	Taxa de Eclosão e Batimento Cardíaco por Minuto.....	31
3.4	Taxa de Deformidade e Sobrevivência Larval.....	32
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1	Taxa de Eclosão.....	33
5.2	Taxa de Batimento Cardíaco por Minuto (BPM).....	35
5.3	Taxa de Deformidade.....	36
5.4	Taxa de Sobrevivência.....	38
5.5	Retardo do desenvolvimento embrionário pelo resfriamento.....	40
6	CONCLUSÃO.....	40
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

A degradação ambiental e a pesca excessiva têm diminuído as populações naturais de peixes e, em função disso, pesquisadores buscam desenvolver e aperfeiçoar técnicas voltadas à conservação dessas espécies. Entre os teleósteos, o Zebrafish (*Danio rerio*) oferece um modelo único de vertebrados para estudos nas áreas de pesquisa como desenvolvimento de medicamentos, modelagem de doenças e outras explorações biológicas (Mushtaq *et al.*, 2013). O pequeno porte, fácil manejo reprodutivo e hábito social, fazem dessa espécie um modelo experimental estabelecido no meio científico, em ensaios de toxicidade e monitoramento ambiental (Escaleira, 2017; Tian *et al.*, 2019). O zebrafish (*Danio rerio*) é um modelo experimental muito utilizado, por ter transparência embrionária e facilitar análises e estudos por observação ocular, dando acesso a circulação e transporte de substâncias (Fishman *et al.*, 2001; Montheo *et al.*, 2020). Além disso, a semelhança genômica com humanos confere a este modelo um papel importante na biomedicina (Simonetti *et al.*, 2015) tornando extremamente importante a preservação das diversas linhagens mantidas em laboratórios no mundo todo, podendo também servir de base para desenvolvimento de estudos em outras espécies de peixes em situação de vulnerabilidade.

Nessa vertente, técnicas de criopreservação e resfriamento de gametas e embriões têm sido usadas como importantes ferramentas na preservação de diversas espécies aquáticas. (Mara *et al.*, 2013; Parnpai *et al.*, 2016; Melo *et al.*, 2018). Porém, as técnicas de criopreservação desenvolvidas até o momento não contemplam embriões de peixes, pois esses embriões apresentam características que dificultam a eficácia desse procedimento. Além disso a alta sensibilidade dos embriões a baixas temperaturas, a presença de anexos embrionários complexos que dificultam o equilíbrio osmótico, o sub-desenvolvimento das vias metabólicas responsáveis pela proteção aos componentes tóxicos dos crioprotetores, a grande quantidade de gema e alto teor lipídico e presença de membrana com barreiras impermeáveis afetando a penetração de crioprotetores também dificultam a obtenção de bons resultados de criopreservação (Liu *et al.*, 1999;

Zhang *et al.*, 2003; Lahnsteiner, 2008; Faragó *et al.*, 2017). Estudos têm sido desenvolvidos na tentativa de contornar tais obstáculos, incluindo a remoção do córion, seleção de estágios embrionários mais avançados, uso de crioprotetores, remoção parcial da gema, e indução a anóxia (Lui *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2003; Higaki *et al.*, 2013). Assim como também a utilização bem sucedida de nanopartículas de ouro para o reaquecimento com laser dos embriões, porém com tecnologias ainda onerosas de aplicação laboratorial (Kanaev *et al.*, 2017).

A técnica de resfriamento, por outro lado, é amplamente aplicada em embriões de várias espécies de peixes (Zhang *et al.*, 1993; Streit Jr. *et al.*, 2007; Fornari *et al.*, 2014) uma vez que, ao contrário do congelamento, a temperatura não é crítica e assim não ocasiona a formação de cristais de gelo letais para as células. Além disso, os crioprotetores podem ser dispensáveis ou administrados em menores quantidades, reduzindo desse modo a mortalidade ocasionada pela toxicidade (Ahammad *et al.*, 2003; Lahnsteiner, 2009). Atualmente, o transporte de embriões de peixes é feito na utilização de frascos de 250 ml contendo água do tanque, na proporção média de 1,5 ml: 1 embrião sem a utilização de crioprotetores ou medidas de retardamento do desenvolvimento (Barton *et al.*, 2020), o que leva a danos morfológicos e baixos índices de sobrevivência gerados durante o transporte, sendo feito por curtos/ longos períodos (1-24h).

Em relação ao uso do zebrafish para estudos de criopreservação, sabe-se que os estágios de desenvolvimento embrionário mais avançados, a partir do período de segmentação (Lahnsteiner *et al.*, 2009) são mais indicados para procedimentos de baixa temperatura nesses embriões (Zhang *et al.*, 2003; Paes *et al.*, 2017) Entretanto, informações sobre as melhores condições de temperatura e período de armazenamento ainda são confusas e controversas na literatura (Paes *et al.*, 2017), evidenciando a necessidade de protocolos confiáveis e padronizados para essa espécie. Devido a sua alta sensibilidade ao frio, características também apresentadas por algumas espécies nativas, tais protocolos podem guiar o manejo de outras espécies nesse processo. Atualmente, diversos protocolos estão sendo testados na tentativa de elencar a melhor forma de conservação de embriões de peixes teleósteos (Pereira *et al.*, 2015). O transporte de material genético entre laboratórios e estabelecimentos

contribuirá diretamente com as pesquisas, estabelecendo linhagens genéticas específicas e auxiliando na conservação de espécies (Digmayer et al., 2013).

Portanto, o objetivo desse trabalho foi otimizar um protocolo para resfriamento de embriões de zebrafish (*Danio rerio*), considerando aspectos como taxa de eclosão, taxa de deformidade, frequência cardíaca e taxa de deformidade larval, contribuindo com sua preservação, bem como o estudo do resfriamento em embriões de peixes, colaborando para futuras biotecnologias para transporte de linhagens genéticas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A espécie em estudo

Também conhecido como peixe-zebra, paulistinha ou zebrafish, o *Danio rerio* é um peixe de água doce proveniente da Ásia, e amplamente utilizado nas pesquisas. É um animal de pequeno porte, medindo aproximadamente 4 cm de comprimento ao atingir maturidade sexual, possui manejo e reprodução fáceis e bem conhecidos devido à popularidade da espécie no meio científico. Além dessas características, apresentam hábito social e genes homólogos aos mamíferos (Gerlai et al., 2006).

A espécie tornou-se um modelo experimental consolidado, mesmo que ainda seja necessário aumentar o conhecimento e entendimento sobre o zebrafish, desenvolvem-se estudos voltados para humanos, tendo em vista a semelhança no genoma, e ainda pelo custo-benefício em comparação com outros modelos (Maxmino et al., 2013; Simonetti et al., 2015). Neste cenário, embriões de zebrafish têm servido como objeto de estudo em importantes áreas, como por exemplo na investigação de impactos negativos no ambiente aquático (Cheng et al., 2007), toxicidade de drogas (Maxmino et al., 2013) e de matéria orgânica na água (Holmberg e Holmgren, 2006; Lin, et al., 2007; Lahnsteiner, 2008), oxigênio dissolvido (Strecker, 2011), estudo da formação muscular (Escaleira, 2017). Além disso, muitos esforços estão sendo feitos para se estabelecer a criopreservação de

embriões de peixes, utilizando embriões de zebrafish (Zhang *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2001; Lahnsteiner, 2008).

2.2 Desenvolvimento embrionário em peixes

O desenvolvimento embrionário em teleósteos se inicia com a fecundação do oócito pelo espermatozoide, e compreende todas as fases subsequentes de formação do embrião. Essas fases são classificadas na literatura pela caracterização morfológica e cronológica de eventos, e pode variar entre as espécies.

Estudos voltados à embriologia permitem conhecer melhor a biologia das espécies em aspectos morfológicos, fisiológicos e comportamentais, além de auxiliar no esclarecimento dos problemas que influenciam na mortalidade larval (Dos Anjos *et al.*, 2006), pois é no ciclo embrionário que o animal apresenta maior vulnerabilidade a qualquer distúrbio abiótico (Andradde *et al.*, 2014). Segundo Luz *et al.* (2018), compreender sobre os estágios iniciais de vida do animal é fundamental para se conhecer e compreender seu relógio biológico, possibilitando um controle de reprodução, além de possibilitar conhecer os anexos embrionários e sua atuação durante o desenvolvimento do embrião.

As principais fases do ciclo embrionário em peixes teleósteos encontradas na literatura são: zigoto, clivagem, blastulação, gastrulação segmentação, a qual pode ser dividida em outras fases (somitagem, faríngea, fases primordiais), e eclosão (Kimmel *et al.*, 1995; Godinho *et al.*, 2002; Arashiro *et al.*, 2018).

2.3 Fases do desenvolvimento embrionário do zebrafish (*Danio rerio*)

O desenvolvimento embrionário do zebrafish é conhecido do meio acadêmico por diversos trabalhos (Kimmel *et al.*, 1995; Strecker *et al.*, 2011; Ribas *et al.*, 2014; Coutinho *et al.*, 2018). O período de desenvolvimento em temperatura

de 28 °C, encerra-se em 72 h após a fecundação, apresentando os seguintes estágios:

Fase Zigoto

Ocorre imediatamente após a fertilização. O córion começa a se expandir e o ovo absorve água ocasionando uma separação entre córion e a membrana vitelina, formando o espaço perivitelino. Esse espaço fornece proteção mecânica ao embrião, impedindo prováveis injúrias que podem ser causadas, por exemplo, pelas correntezas das águas. Também é a fase de formação do blastodisco, em que é possível observar a formação dos polos, animal e vegetal que irão se diferenciar nas próximas fases.

Fase Clivagem

Nessa fase, o polo animal, ou blastodisco, passa por sucessivas divisões mitóticas, cada divisão é denominada como uma clivagem. A cada clivagem, o número de células é duplicado, e cada célula é denominada de blastômero, portanto, o número de blastômeros que forma o polo animal aumenta em quantidade e diminui em tamanho a cada clivagem. Normalmente classifica-se como fase de clivagem, as divisões que ocorrem até o blastodisco atingir 64 blastômeros, embora as divisões continuem.

Fase Blástula

Esta fase se inicia na sexta clivagem, onde o número de células é duplicado nas sequências de 128, 256 e 512 blastômeros. A partir de 128 blastômeros, o arranjo que forma sob o polo vegetal assemelha-se com uma amora, por essa razão muitos autores a classificam também como fase de mórula.

O tecido formado até aqui, segue classificado como blastoderme. Normalmente a camada sincicial do vitelo começa a se formar nessa fase.

Fase Gástrula

Na gastrulação, as células do blastoderme iniciam o movimento da epibolia, avançando em direção à gema e evoluindo gradativamente. Aos 50% de epibolia é considerado por alguns autores como a garantia da fertilização, é quando a blastoderme começa a envolver o vitelo e a se dobrar sobre si mesma dando início a diferenciação de tecidos (ectoderma, endoderma e mesoderma). Ocorrem em seguidas etapas de 75% e 90% de epibolia, quando então é observado o fechamento do blastóporo.

Fase de Segmentação

Nessa fase a diferenciação dos polos cefálico e caudal são mais evidentes, e o aparecimento dos somitos, vesículas e alguns órgãos externos e internos do embrião podem ser observados se em um desenvolvimento lento, com primeiros indícios de notocorda.

Fase Faríngea

O nome dessa fase é característico da formação dos arcos faríngeos primordiais, e compreende também eventos importantes como a rápida elevação da cabeça, alongamento caudal, somitos e vesículas mais proeminentes e o aparecimento de lobos fontais e notocorda bem desenvolvida.

Eclosão

Nessa fase o embrião continua crescendo, intestino e demais órgãos associados são bem desenvolvidos, nadadeiras peitorais, mandíbulas e brânquias são mais evidentes e logo ocorre a eclosão, evento em que o embrião rompe o córion através de movimentos vigorosos e incessantes, sendo então a larva liberada para o nado livre.

É importante ressaltar que, em algumas situações, caso o embrião não tenha rompido o córion, mas a morfologia dessa fase foi alcançada e não houve eclosão em até três dias, mesmo dentro do córion já se considera início do período larval (Kimmel *et al.*,1995). Na figura abaixo (fig. 1) é possível observar a organização morfológica de cada fase de desenvolvimento embrionário da espécie *Danio rerio*.

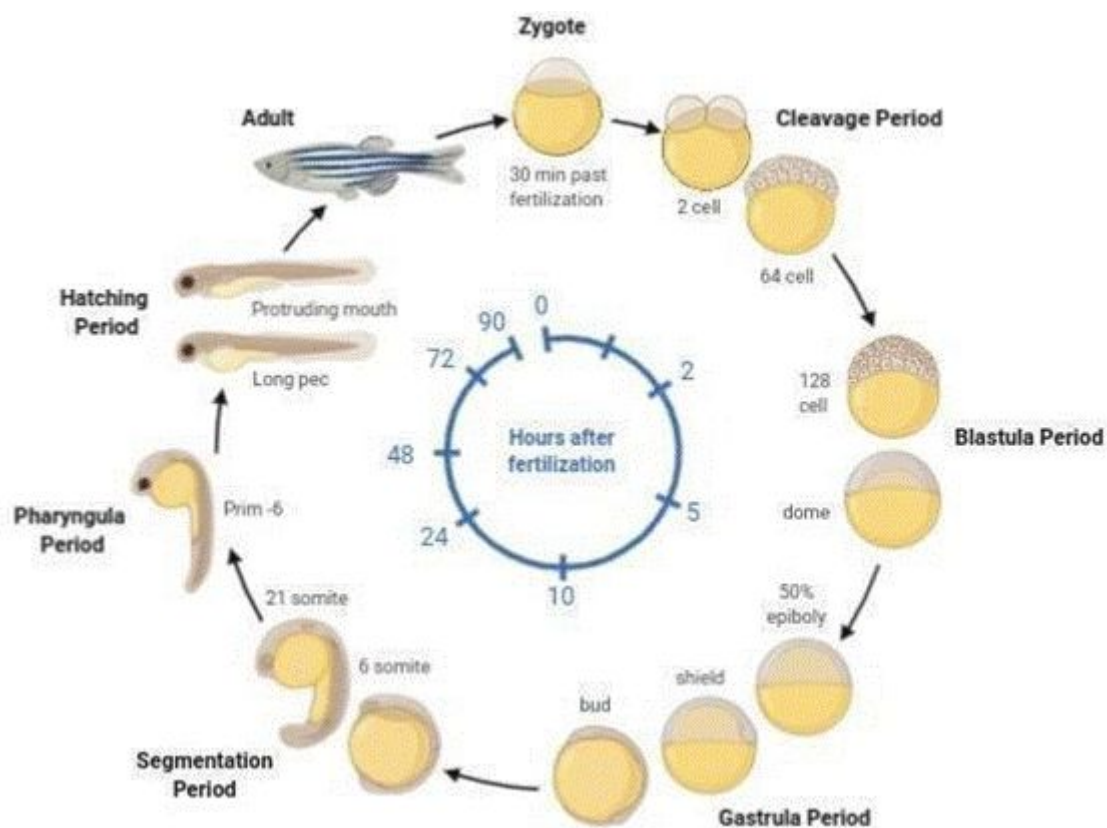


Figura 1. Representação da morfologia embrionária de *Danio rerio*. Fonte: BioRender (2020).

2.4 Resfriamento de embriões de peixes

A criopreservação pode ser definida como a manutenção de produtos biológicos em temperaturas abaixo de zero, abaixo de -80°C e normalmente abaixo de -140°C . Essa tecnologia permite o armazenamento de longo prazo, uma vez que cessa a atividade celular. No entanto, na criopreservação ocorrem diferentes efeitos adversos as células, tais como a formação de cristais de gelo, os efeitos citotóxicos da solução crioprotetora e o choque osmótico (Mazur, 1984). Por outro lado, o armazenamento hipotérmico geralmente inclui processos que mantêm as células em temperaturas acima de 0°C , mas abaixo de uma faixa de temperatura normotérmica (36 a 37°C), reduzindo o metabolismo celular em vez de pará-lo totalmente. Ou seja, o resfriamento retarda a atividade celular, tornando o desenrolar dos eventos de formação embrionária mais lentos (Bart *et al.*, 2000). Essa biotecnologia pode ser utilizada com o intuito de sincronizar lotes de desovas distintas permitindo o melhoramento no uso de sistemas de reprodução em cativeiro, tanto para produtores com capacidade limitada, quanto para laboratórios de reprodução estabelecidos, visto que a prole irá atingir maturidade sexual ao mesmo tempo (Ahammed *et al.*, 2003).

A técnica de transplante de células germinativas primordiais (CGPs), por exemplo, precisa de sincronia nos estágios de desenvolvimento embrionário, e sabe-se que cada espécie possui tempo de desenvolvimento específico (Arashiro *et al.*, 2018). O armazenamento no frio minimiza a sensibilidade ao estresse que pode ser causado ao se transportar embriões (Streit Jr. *et al.*, 2007), logo, é uma biotecnologia que contribui com a transferência dos embriões entre laboratórios especializados, a fim de desenvolver estudos específicos.

2.4.1 Resfriamento de embriões de zebrafish

A formação de cristais de gelo dentro do embrião está entre os principais fatores que afetam a sobrevivência e integridade dos embriões após procedimentos de baixas temperaturas, mesmo com o uso de crioprotetores (Bart *et al.*, 2000). Com o objetivo de superar esses desafios do resfriamento de embriões de zebrafish, os autores testaram diferentes técnicas em temperaturas

entre 0°C – 14°C, Hagedorn e colaboradores (1997) testaram a retirada do córion do embrião antes do resfriamento, com a hipótese de que poderia facilitar a entrada do crioprotetor, mas nenhuma influência foi observada. A mesma situação foi relatada posteriormente por Liu *et al.*, (1999), porém em outro estudo, buscando contornar o obstáculo da alta sensibilidade térmica do embrião devido ao alto teor de lipídios, autores sugeriram a remoção parcial do vitelo antes do resfriamento dos embriões de zebrafish, porém houve alta taxa de deformidade em embriões a partir de 50% de epibolia, relatando por Liu *et al.*, 2001. Os autores complementam ainda que a lesão por frio em embriões de 64 células parece ser uma consequência do tempo de exposição a baixas temperaturas (0 °C), enfatizando que além do estágio de desenvolvimento do embrião, também é necessário observar o período mais adequado de armazenamento. Embriões, no estágio de “somitagem” (5 somitos), incubados em água e solução salina em temperatura de 8 °C por 30 h apresentaram viabilidade de 50% como relata Lahnsteiner *et al.*, 2009.

Um estudo, na tentativa de aumentar a viabilidade embrionária após resfriamento a 0 °C, induziram embriões à anoxia com a hipótese de que a falta de oxigenação poderia diminuir atividades metabólicas antes do resfriamento tornando o embrião menos sensível ao frio (Zhang *et al.*, 2003). Os autores compararam este efeito com o uso do metanol como crioprotetor, e os resultados mostraram 95% de sobrevivência larval nos grupos tratados com metanol (1M), se equiparando ao controle (não resfriados). No entanto na avaliação dos efeitos da inibição da oxigenação, não houve diferença significativa na tolerância e as taxas de eclosão (Tabela 1).

Trabalho	Objetivo	Principais Resultados	Solução	Tempo	Estágio
<p>Zhang et al., 1995</p>	<p>Avaliar os estágios mais sensíveis ao resfriamento e os efeitos crioprotetores na sensibilidade ao frio.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - A concentração de 1M de metanol, quando suplementado com sacarose (0,1 M), foi a melhor para a sobrevivência dos embriões; - A presença de sacarose ou trealose aumentou ligeiramente a tolerância ao resfriamento dos embriões; - Maior taxa de mortalidade em concentração de 5M de metanol e menor taxa a 1M; 	<p>Metanol+ sacarose ou trealose</p>	<p>0° C</p> <p>1, 8, 24, 48h</p>	<p>-50% epibolia</p> <p>-6 somitos</p> <p>-26 somitos</p>
<p>Hagedorn et al., 1997</p>	<p>Avaliar os estágios mais sensíveis a baixas temperaturas, e a retirada do córion na influência da permeabilidade de crioprotetores.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Embriões em estágios mais avançados foram mais respectivamente mais resistentes ao frio; - A remoção do córion não alterou o padrão de sensibilidade ao frio em nenhuma fase; 	<p>1,5dimetilsulfóxido 2,0 M propilenoglicol</p> <p>2,0 M metanol+ solução de Hanks</p>	<p>0° C</p>	<p>-64 células,</p> <p>-50, 75 e 100% de epibolia</p> <p>-3 somitos</p>

Lui, et al., 1999	Investigar o efeito da remoção parcial do vitelo na sensibilidade a baixas temperaturas, em diferentes estágios de desenvolvimento embrionário do zebrafish.	<ul style="list-style-type: none"> - Embriões mais desenvolvidos (de 27 até 49 h) tiveram maior taxa de sobrevivência, enquanto até 26 somitos (24 h) tiveram menor taxa. - Os resultados indicam que a remoção parcial da gema aumentou a tolerância de embriões para resfriamento; 	Solução de Hank	6 e 24 h a 0° C	- 26 somitos
Lui et al., 2000	Investigar o efeito da taxa de resfriamento e da remoção parcial da gema no dano por frio em embriões de zebrafish.	- Os embriões de 50% de epibolia com redução de gema mostraram maior sobrevivência que os embriões do controle após resfriamento, entretanto, com alta taxa de deformidade.	Solução de Hank	0° a 5° C de 10 a 30 min	<ul style="list-style-type: none"> -64 células, -50% de epibolia -6-somito

<p>Zhang <i>et al.</i>, 2002</p>	<p>Comparar o efeito de metanol e de anóxia na viabilidade do embrião resfriado, e observar se o estágio de mais indicado para resfriamento.</p>	<p>- Efeito do metanol:</p> <p>-A adição de 1 M de metanol no meio embrionário aumentou a taxa de sobrevivência do embrião dos embriões a partir de 50% de epibolia;</p> <p>- A taxa de sobrevivência do grupo tratado com metanol foi de 95%, parecido com o grupo não resfriado (controle);</p> <p>- Nenhum embrião do grupo resfriado sem Metanol sobreviveu;</p> <p>Efeito da anóxia</p> <p>A anóxia não influenciou na viabilidade dos embriões;</p>	<p>Metanol + solução de Hank</p>	<p>-64 células:</p> <p>10-30 min, a 0° C</p> <p>Demais estágios= 1h a -5° C</p>	<p>-64 células,</p> <p>-50% Epibolia,</p> <p>-6-somitos</p>
		<p>- Água: 50% dos embriões no estágio de</p>	<p>Solução salina</p>		<p>64 células</p>

<p>Lahnsteiner et al., 2009</p>	<p>Avaliar tempo e temperatura de armazenamento viável para os embriões, e se soluções salinas são superiores à água como meio de armazenamento.</p>	<p>somitos sobreviveram a um período de resfriamento de 28 h, e 50% dos embriões do estágio prim-5 passam por um período de resfriamento de 41 h.-Solução salina: 5 somitos tiveram sobrevivência de 50%; embriões em estágio prim-5, taxa de sobrevivência de 50% após 46 h;</p>		<p>12, 24, 30, 36, 42, 48, 54 horas a 8° C</p>	<p>- 50% epibolia - 5 somitos</p>
<p>Lin et al., 2009</p>	<p>Determinar o efeito do congelamento na expressão de genes em embriões de zebrafish.</p>	<p>- As baixas temperaturas interromperam o padrão normal (comparando com o grupo controle) de expressão gênica dos embriões; os genes envolvidos podem estar relacionados com proteínas responsáveis por fatores cruciais no desenvolvimento;</p>	<p>- 2 M de metanol + 0,2 M de sacarose + PBS</p>	<p>Resfriados a 1° C por 24h</p>	<p>50% Epibolia e 100% Epibolia</p>
	<p>Observar se após o resfriamento com diferentes concentrações de metanol, haveria dano</p>	<p>- Nos embriões tratados com metanol, não houve nenhuma diferença significativa no número de cópias de mtDNA ao longo das 3 primeiras horas, embora os números tenham</p>	<p>Metanol+ solução de Hanks, concentrações M1 M2, M3 e M4</p>	<p>1° C por 30 min a 1 h</p>	<p>50% Epibolia 100% Epibolia</p>

<p>Spiking et al., 2010</p>	<p>ou deficiência na replicação de DNA mitocondrial.</p>	<p>aumentado entre 3 e 24 h em todas as concentrações, exceto na concentração de 3 M;</p>			
<p>Desai et al., 2010</p>	<p>Avaliar a expressão genes em embriões de zebrafish após exposição a 0 C por diferentes tempos.</p>	<p>- A PCR em tempo real mostrou que a expressão de genes foi significativamente diminuída em 3 horas de resfriamento, em comparação com 30 min;</p> <p>- Estágio de 100% de Epibolia foi mais resistente ao frio, que os estágios anteriores;</p>	<p>-</p>	<p>0° C, 30 min, 1, 2 e 3 horas</p>	<p>50% epibolia 75% epibolia 100% -Epibolia</p>
<p>Desai et al., 2011</p>	<p>Investigar os papéis potenciais dos genes hsp47 e hsp90 em condições de estresse.</p>	<p>- Aumento significativo na expressão gênica após o procedimento de resfriamento, em relação ao grupo não resfriado (controle);</p>	<p>-</p>	<p>0° C por 30 min e 60 min</p>	<p>50% Epibolia</p>

Desai et al., 2015	<p>Descobrir o período de armazenamento e resfriamento ideal</p> <p>(período de transporte comumente usados) usando MeOH como crioprotetor.</p>	<p>- Os genes sox tiveram sua expressão significativamente aumentadas nos embriões resfriado, em comparação com controles não resfriados;</p> <p>- O nível de diminuição da expressão gênica foi menos afetado à medida que as concentrações de Metanol aumentaram;</p>	<p>Metanol</p> <p>0,2, 0,5 e 1 M</p> <p>+60 l g / mL de sal marinho em água destilada</p>	<p>0° C</p> <p>3, 6, 18 e 24h</p>	50% Epibolia
	<p>Monitorar o desenvolvimento de embriões resfriados de <i>Danio rerio</i> em incubação, crescimento e</p>	<p>- Algumas anormalidades foram observadas apenas nas larvas do tratamento de 18 h.</p> <p>- O período de armazenamento influenciou no tamanho, índice de deformidade, e</p>	<p>1 M de metanol + Sacarose 0,1 M,</p>	<p>0 ± 2 °C</p> <p>6 e 18 horas</p>	50% Epibolia

Paes et al., 2017	maturação sexual.	sobrevivência a longo prazo com baixa para 18h. - Ao atingir a fase adulta, o grupo resfriado apresentou deficiência na maturação gonadal.			
--------------------------	-------------------	---	--	--	--

Em trabalhos como Faragó et al., 2017, onde foi investigado se o condicionamento prévio do blastômero em tratamento de pressão hidrostática (PTAT) melhora a tolerância ao frio (em $0^{\circ} \pm 0,3$) de embriões de zebrafish em termos de sobrevivência pós-eclosão. Obtiveram ótimos resultados com taxas de sobrevivência consideravelmente superiores às do grupo controle ($37,6 \pm 3,4\%$ dos embriões eclodiram no grupo resfriado com PTAT, em comparação com $23,0 \pm 3,8\%$ para o grupo resfriado de controle). Ao final do experimento 30dpf foram alcançadas taxas superiores a 60% de sobrevivência larval. Entretanto, os autores enfatizam que, diante das dificuldades enfrentadas, a maior tem sido otimizar o período de exposição ao frio, e a temperatura ideal para armazenamento de embriões de zebrafish. Um ponto importante a se considerar no atual cenário do resfriamento de embriões de zebrafish, é que a grande maioria dos estudos trazem resultados de aspectos imediatos à eclosão, como a taxa de sobrevivência larval, deformidades ou crescimento larval (além da taxa de eclosão), e pouco se explora sobre a viabilidade reprodutiva desses animais.

Uma exceção nesse cenário é o estudo de Paes *et al.*, (2017) que avaliou os parâmetros usuais do embrião, e a maturação sexual quando adultos. Os autores relatam que embriões resfriados a 0°C por 6 e 18 horas, não apresentaram eficiência na maturação gonadal ao atingir a fase (5~6 meses segundo Kimmel *et al.*, 1995). Considerando a importância da reprodução para a existência e perpetuação das espécies é importante agregar avaliações desse caráter ao se estudar sobre viabilidade embrionária e técnicas de preservação, sobretudo, em espécies de grande valor científico, como é o caso do *Danio rerio*.

2.4.2 Características que dificultam o resfriamento de embriões de zebrafish

De acordo com Liu *et al.*, (1999), e corroborado por Spiking *et al.* Desai *et al.*, (2015) e Paes *et al.*, (2017), as principais características que impedem o sucesso na criopreservação e no resfriamento de embriões do zebrafish são:

- a) O tamanho grande do vitelo e a espessura viscosa do seu conteúdo;
- b) O grande tamanho do embrião considerando a expansão do córion e o

- tamanho menor do embrião na parte interna, retardando o fluxo de água e crioprotetor;
- c) A natureza dos complexos compartimentos: a blastoderme e vitelo, com diferentes propriedades osmóticas, causando estresse por níveis de concentração;
 - d) Alta sensibilidade do embrião ao frio;
 - e) Barreiras impermeáveis para os crioprotetores resultando em crioprotetor insuficiente ou tóxico uma vez que a quantidade no compartimento interior se torna estimada;
 - f) O conteúdo lipídico no citoplasma das células embrionárias, que se tornam cada vez maiores com o desenvolvimento, e estão associadas à redução da tolerância ao frio.

2.5 Danos causados por baixas temperaturas

Estudos relataram que baixas temperaturas interromperam o padrão normal de expressão gênica dos embriões de peixes (Desai *et al* 2010; Desai *et al.*, 2011). Os genes envolvidos podem estar relacionados com proteínas responsáveis por fatores cruciais no desenvolvimento, como crescimento, capacidade motora e desenvolvimento de órgãos primitivos (Lin *et al.*, 2009; Desai *et al* 2010; Desai *et al.*, 2011).

Os danos causados por baixas temperaturas também incluem também deformidades morfológicas como anormalidades na cauda e edema pericárdico, insuficiência neural ou muscular que impossibilita o embrião de romper o córion ou nadar, o que causa muitas vezes baixa taxa de eclosão, e outras vezes a taxa de eclosão não corresponde a taxa de sobrevivência larval, pois os indivíduos eclodem, mas não sobrevivem (Faragó *et al.*, 2017).

Anormalidades celulares e teciduais foram observados em larvas tratadas com diferentes concentrações de metanol (M1 M2, M3 e M4), sobretudo maiores índices de danos foram apresentados por embriões expostos a concentrações mais altas (3M) (Spiking *et al.*, 2010).

2.6 Crioprotetores

Agentes crioprotetores, são usados para manter a viabilidade de tecidos ou organismos submetidos criopreservação, ou a temperaturas críticas. Sua função é impedir a formação de cristais de gelo (Best, 2015).

Quando se refere ao princípio da criopreservação de embriões, não há diferença entre criopreservação de embriões de peixes e mamíferos. No entanto, embriões de peixe apresentam vitelo têm uma membrana muito dura e espessa em comparação com as outras células, ademais existem dificuldades não apenas para a transferência de calor durante resfriamento, mas também para a penetração dos crioprotetores (Suzuki *et al.*, 1995).

Apesar disso, o uso de crioprotetores é recomendando com a finalidade de proteger o embrião de peixe (Bart, 2000), porém, o alto nível de toxicidade apresentado por essas soluções é um fator desafiador, devido a afetar diretamente a integridade do embrião. Os crioprotetores são divididos em dois grupos: permeáveis, como por exemplo metanol, DMSO, glicerol e etilenoglicol, e impermeáveis, como a glicose, sacarose e trealose (Connolly *et al.*, 2017).

O Metanol é considerado pela maioria dos autores como o crioprotetor mais eficiente no resfriamento de embriões de peixes, e por essa razão pesquisadores têm se concentrado em compreender sobre sua toxicidade e os níveis de concentrações que não apresentem danos aos embriões (Zhang *et al.*, 2003; Spiking *et al.*, 2010; Desai *et al.*, 2011; Paes *et al.*, 2017). Segundo Connolly *et al.*, (2017) altas concentrações de metanol (3 M) são nocivas e influenciam na viabilidade causando até mesmo necrose nos tecidos do embrião. Geralmente, em fases mais desenvolvidas (acima de 50% de epibolia) o embrião suporta mais a toxidade dos crioprotetores (Zhang *et al.*, 1995; Bart, 2000). Entretanto, a toxicidade varia não só conforme a concentração, mas também conforme a espécie, o tempo e a temperatura de exposição (Zhang *et al.*, 1995; Spiking *et al.*, 2010).

Para produção do meio de resfriamento, o crioprotetor é diluído, com o objetivo de diminuir a sua concentração, e assim, evitar a entrada muito rápida de água na célula e os possíveis picos de estresse osmótico. A diluição pode ser feita em solventes como água destilada, solução de Hanks, solução salina 0,9% e tampão fosfato-salino (PBS) (Hagedorn *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2002; Lahnsteiner, 2009; Lin *et al.*, 2009; Spiking *et al.*, 2010; Desai *et al.*, 2015).

O PBS (*Tampão fosfato-salino*) é uma solução tampão rica em nutrientes e por essa razão, amplamente utilizado de forma precursora para o transporte de embriões de ovelhas (Smith *et al.*, 1994), vacas (Niemann, 1991), camundongos (Nureddin *et al.*, 1990), porcas (Weber *et al.*, 1994) e coelhos (Smorag *et al.*, 1989).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local de Experimentação e Obtenção das Matrizes

O presente estudo foi conduzido no laboratório AQUAM em acordo com o Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal – CONCEA, sendo aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Projeto N° 43876. Foram utilizadas 12 matrizes de zebrafish (*Danio rerio*), sendo 8 fêmeas e 4 machos, obtidos a partir de fornecedor especializado (DELPHIS AQUARIOS ATACADO E VAREJO LTDA, Porto Alegre, RS, CNPJ: 00.187.830/0001-70) e mantidos dentro das dependências do Laboratório AQUAM durante o desenvolvimento do estudo. Os animais foram separados por sexo e aclimatados em aquários de vidro (50Cx25Lx40A – 40 Litros – Vidro: 4mm), onde receberam alimentação regular com ração extrusada e incrementada com náupilo de artêmia salina. A temperatura foi monitorada em $28,3^{\circ}\text{C} \pm 0,8$ e a umidade em $49 \text{ g/m}^3 \pm 3,78$, sob fotoperíodo de 14h Light/ 10h Dark e os parâmetros físico-químicos da água monitorados utilizando testes específicos para pH (7,5 ppm), Amônia (0,0 ppm), Nitrito (0,0ppm), Dureza (Muito Branda) e Oxigênio Dissolvido (8,0 ppm)

(LabconTest®). A reprodução das matrizes começou a ser induzida após a aclimação ao ambiente e manejos diários.

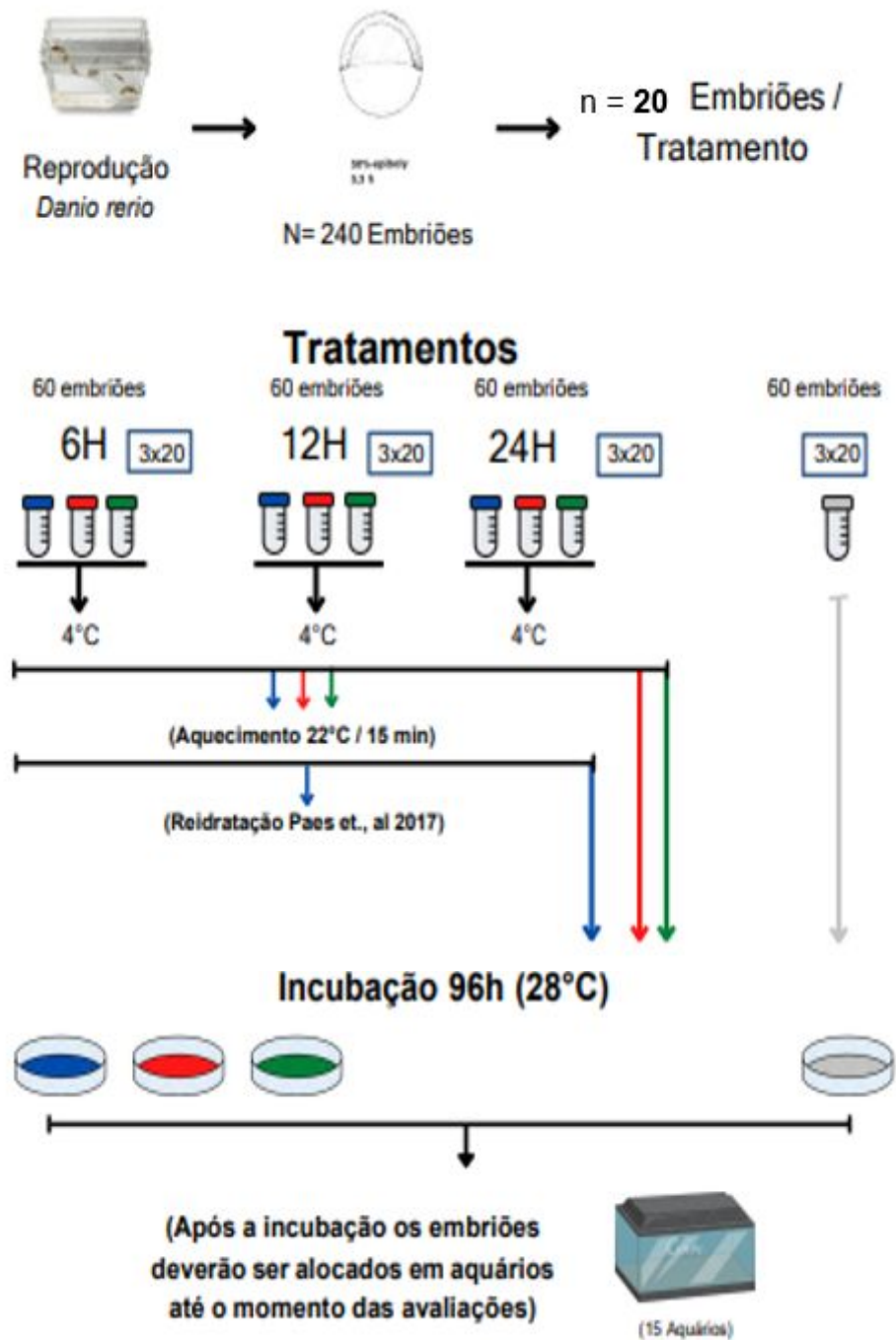
3.2 Resumo do Delineamento Experimental

Com fornecedor legalizado foram obtidas 12 matrizes (8 Fêmeas e 4 Machos) e aclimatadas nas dependências do AQUAM em biotério climatizado à $28^{\circ}\text{C} \pm 0,8$ – os animais foram divididos em aquários por sexo, onde receberam ração extrusada (50% proteína), suplementada com náupilos de artêmia salina, *ad libitum*. A reprodução dos animais ocorreu através do uso de aquários específicos para função, na disposição de 2 fêmeas para 1 macho, separados durante o período noturno através de divisórias, as quais eram removidas ao ligar das luzes artificiais. Após 30 minutos, os oócitos aparentemente fecundados eram recolhidos (N= 240) e passados para placas Petri com 25mL de água de incubação e mantidos dentro do biotério. Após aproximadamente 5,3hpf os embriões com 50% de Epibolia eram transferidos para os tratamentos dentro do prazo de 20 minutos, visando a manutenção no desenvolvimento embrionário proposto. Assim, através de um delineamento inteiramente casualizado e com esquema fatorial 3x3 (3 soluções de resfriamento – PBS; 1M Metanol + 0,1M Sacarose; Água de Incubação x 3 tempos de resfriamento – 6h, 12h e 24h) os embriões eram divididos em 9 tubos Falcon contendo 40mL de solução (n=20), colocados dentro de um isopor adaptado e alocado dentro de um refrigerador em $4^{\circ} \pm 1$. Enquanto o tratamento controle, composto por água de incubação, em 50% de Epibolia era transferido dos tubos Falcon para placas Petri com 25mL de água de incubação e alocados dentro do biotério até o momento da eclosão. Na medida em que os embriões saíram do resfriamento, foram reaquecidos em banho maria (22° - 15 minutos) e o tratamento contendo crioprotetor passou por processo de remoção do metanol e reidratação. Assim, os tratamentos eram suspensos em água de incubação com auxílio de pipeta de Pauster em placas Petri e observados em microscópio óptico (Zoom 40x – Eclipse Si), anotando sobrevivência parcial e desenvolvimento embrionário, Com os tratamentos identificados e etiquetados com o tempo de resfriamento, os embriões

foram colocados em incubação no biotério ($28^{\circ}\text{C} \pm 0,8$) em placas Petri contendo 25mL de água de incubação até o momento da eclosão. Em 72hpf foram coletados dados da frequência cardíaca larval, e em 96hpf (tempo limite para eclosão) foram contabilizados e transferidos para aquários tipo “betteira” (2,1L – Alimentação 3X dia: *Paramecium Sp./ Ad libitum*). Quando ocorreu o término dos 15dpf, as larvas eram contabilizadas para coleta de dados como taxa de deformidade e

sobrevivência, sendo eutanasiados com proporção correta de tricafina. Na figura 02, logo abaixo, podemos observar o delineamento experimental de forma ilustrada.

Figura 2 – Fluxograma do delineamento experimental. A coloração azul representa 1M Metanol + 0,1M Sacarose, a vermelha representa PBS (tampão fosfato-salino), a verde representa Água de Incubação, e o controle é representado pela cor cinza. Fonte: Elaborado por



3.2.1 Reprodução

As matrizes foram selecionadas e dispostas de forma aleatória na proporção de 2 fêmeas:1 macho em cada câmara de reprodução, totalizando 4 câmaras montadas por repetição. O macho ficava separado das fêmeas dentro da câmara através de divisória, onde passavam a noite juntos na espera da remoção da divisória assim que as luzes artificiais ligassem. Após a espera de 30 minutos, os embriões provenientes das quatro câmaras reprodutivas, que foram considerados fecundados, eram coletados com auxílio de uma pipeta de Pasteur e colocados em uma placa Petri contendo 25 mL de água de incubação formando um pool de embriões, e colocados a $28,3^{\circ}\text{C} \pm 0,8$ até o momento que alcançassem 50% de Epibolia, que segundo Kimmel *et al.*, 1995 acontece em perto de 5,3 h após a fecundação. Durante o experimento, o estágio de desenvolvimento embrionário de 50% de Epibolia foi alcançado variando em média 30 minutos em relação ao trabalho de Kimmel *et al.*, 1995.

3.2.2 Cálculo Amostral

O cálculo amostral foi feito com base no trabalho de Charan e Kantharia (2013), utilizando o software G*Power. O número total de amostras foi baseado no cálculo amostral e em estudos anteriormente publicados com metodologias semelhantes (LIU, 1999; Lahnsteiner 2011). O delineamento experimental consiste em três soluções de resfriamento e três tempos de resfriamento (3X3) e o controle. Dentro de cada repetição, na disposição entre o tempo de resfriamento e tratamento, 20 embriões por tubo Falcon.

3.2.3 Desenvolvimento Embrionário

Quando os embriões entraram no estágio de 50% de Epibolia, a manipulação ocorreu dentro de 20 minutos para que não ocorresse o seu desenvolvimento. Os tubos Falcon foram preenchidos com 40 mL de solução em temperatura ambiente ($24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,62$) e mantidos em um isopor adaptado com furos para suporte interno a geladeira, também servindo como isolante térmico extra para reduzir variações internas da geladeira ($4^{\circ}\text{C} \pm 1$). As soluções dos tratamentos foram mantidas à $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,62$ (Temperatura Ambiente; Umidade Relativa: $55\text{ g/m}^3 \pm 6,74$) durante o manejo do experimento, enquanto os embriões em 50% de epibolia aguardavam a equalização de temperatura com o ambiente para a distribuição nos tubos Falcon. No momento de 50% de Epibolia foram separados 20 embriões por tubo Falcon, totalizando 9 tubos (1M Metanol + 0,1M Sacarose (pH 6,9 – Osmolalidade 1134,33mOsm/kg) , PBS (pH 7,2 – 267,66 mOsm/kg e Água de Incubação, proveniente do tratamento municipal de Porto Alegre e condicionada para tamponamento de pH e substrato bacteriano para tratamento de amônia e nitrito (pH 7,5 – 1,67 mOsm/kg)) , dispostos em 6, 12 e 24h de resfriamento), adicionados no suporte de isopor e levados ao resfriamento ($4^{\circ}\text{C} \pm 1$) ao mesmo tempo. O controle, continha água de incubação, sendo distribuídos 60 embriões em 3 Falcons com 40ml de água de incubação era separado do pool de embriões e colocado em placa Petri com 25mL de Água de Incubação à $28,3^{\circ}\text{C} \pm 0,8$, com 20 embriões/ placa.

3.2.4 Reaquecimento e Análise

Após resfriamento, os tubos foram colocados em banho-maria em temperatura ambiente ($24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,62$) por 15 min para aquecer. Após o aquecimento os embriões foram transferidos para Placas Petri contendo água de incubação em temperatura ambiente e aquecidos a 28°C . O tratamento 1 M metanol + 0,1 M sacarose passou pela reidratação para remoção do crioprotetor, de acordo com o protocolo estabelecido por Paes *et al.*, (2017). Remove-se 10% da solução do tubo Falcon e adiciona-se a mesma proporção de água de

incubação e aguarda-se 10 minutos, assim repete-se o processo aumentando para uma alíquota de retirada de 30%; retirada de 60% e de 85%, ao final os embriões recebem 3 lavagens completas. Após o processo de reaquecimento, os tratamentos foram transferidos para Placas petri identificadas com 25mL de água de incubação e levados a temperatura de $28,3^{\circ}\text{C} \pm 0,8$.

Após o tempo 6h sair do resfriamento e passar pelo processo de reaquecimento, o controle e os tratamentos passavam por análise em microscopia óptica com aumento de 40X (Nikon Eclipse Si), anotava-se o desenvolvimento embrionário para cálculo de retardo causado pelo resfriamento. Assim, nos tempos 12h e 24h repetia-se o processo para averiguação do desenvolvimento após retirada do resfriamento e reaquecimento. Durante as observações foram removidos ovos gorados para não ocorrer quimio-sinalização celular.

3.3 Taxa de Eclosão e Batimento Cardíaco por Minuto

Após 72h de desenvolvimento embrionário analisou-se o batimento cardíaco, pois os animais ainda não estavam de forma nadante livre – não afetando as taxas com alterações sobre esforço de nado, através do uso de microscopia óptica com aumento de 40X (Nikon Eclipse Si). Fazendo uso de um contador de células e um cronômetro marcando 15 segundos, podemos obter a média de batimentos do tratamento, através da multiplicação por 4 obtemos o batimento por minuto, em adaptação de Hoage et al, 2012. Foi repetido o processo por placa, através de seleção aleatória, com 10 embriões. O cálculo da taxa de eclosão, forma *in vivo*, com auxílio de estereoscópio seguiu a fórmula:

$$E\% = \frac{L_e}{T_e} \times 100$$

E% = Taxa de eclosão (%)

Le = Larvas Eclodidas

Te = Total de Embriões Resfriados

Após aguardar 96h, para eclosão total dos embriões (Kimmel et al, 1995), os animais foram passados para aquários (15Cx10Lx14A – 2,1 Litros) sendo mantidos separados com tempo e tratamento identificados, iniciando-se o processo de oferta de *paramecium* para alimentação dos animais, e seguiram para até o momento das análises do cálculo de deformidade.

3.4 Taxa de Deformidade e Sobrevivência Larval

A taxa de deformidade, forma *in vivo*, foi calculada 15 dpf com auxílio de estereoscópio através da fórmula:

$$D\% = \frac{Ld}{Le} \times 100$$

D% = Larvas Deformadas

Ld = Larvas deformadas

Le = Larvas Eclodidas

Logo após o término da estimativa das taxas de deformidade, foram coletados dados para as taxas de sobrevivência larval por tratamento dentro dos tempos. A taxa é calculada com a subtração do total de embriões expostos ao resfriamento menos o total restante após 15 dias pós-fecundação.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e quanto à homogeneidade pelo teste de Levene. Quando os dados eram normais, os tratamentos foram comparados usando análise de variância duas vias considerando o efeito do tempo de resfriamento e a interação entre os três fatores (soluções). A taxa de eclosão foi analisada ao longo do tempo usando o teste Two-Way ANOVA seguindo o teste de Tukey para questionar quais médias realmente diferem. Os dados com distribuição normal são apresentados como média \pm desvio padrão.

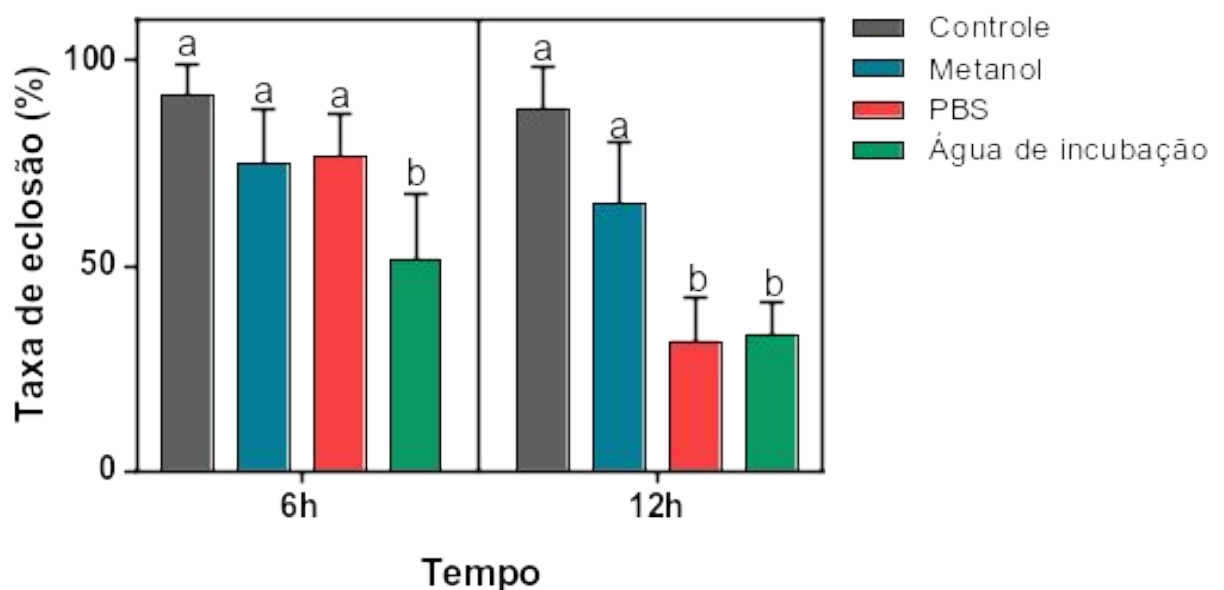
Para as demais análises com distribuição não paramétrica, o teste de Kruskal - Wallis foi usado seguido do teste múltiplo comparação de médias Dunn, pois o teste de K-W permite rejeitar H0. Os dados não paramétricos são apresentados em gráficos boxplot com mediana e valores máximos-mínimos. A significância estatística foi atribuída a um valor de $P \leq 0,05$ para todos os testes. O software utilizado para análises estatísticas foi o RStudio® e para confecção dos gráficos utilizamos o GraphPad Prism 9®.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Taxa de Eclosão

Após o término das 96 hpf a taxa de eclosão demonstrou que a solução de 1M Metanol + 0,1M Sacarose ($69\% \pm 14,63$) apresentou maior capacidade para garantir a manutenção dos embriões após 12 h, durante o processo de resfriamento à $4^{\circ}\text{C} \pm 1$, em comparação ao PBS($31,5\% \pm 8,5$)e a Água de Incubação ($33,25\% \pm 6,23$) (Figura 3).

Figura 03. Taxa de Eclosão.



Fonte: Elaborado por Fabris, 2023.

Figura 03. Taxa de eclosão de larvas de *Danio rerio* resfriados por 24 horas em três soluções e controle. Letras minúsculas distintas (*ab*) indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$). Anova one-way F (6,21) = 20,33 ($p = 0,0001$). Teste múltiplo comparação de médias Tukey.

* o tratamento 24h não apresentou eclosão

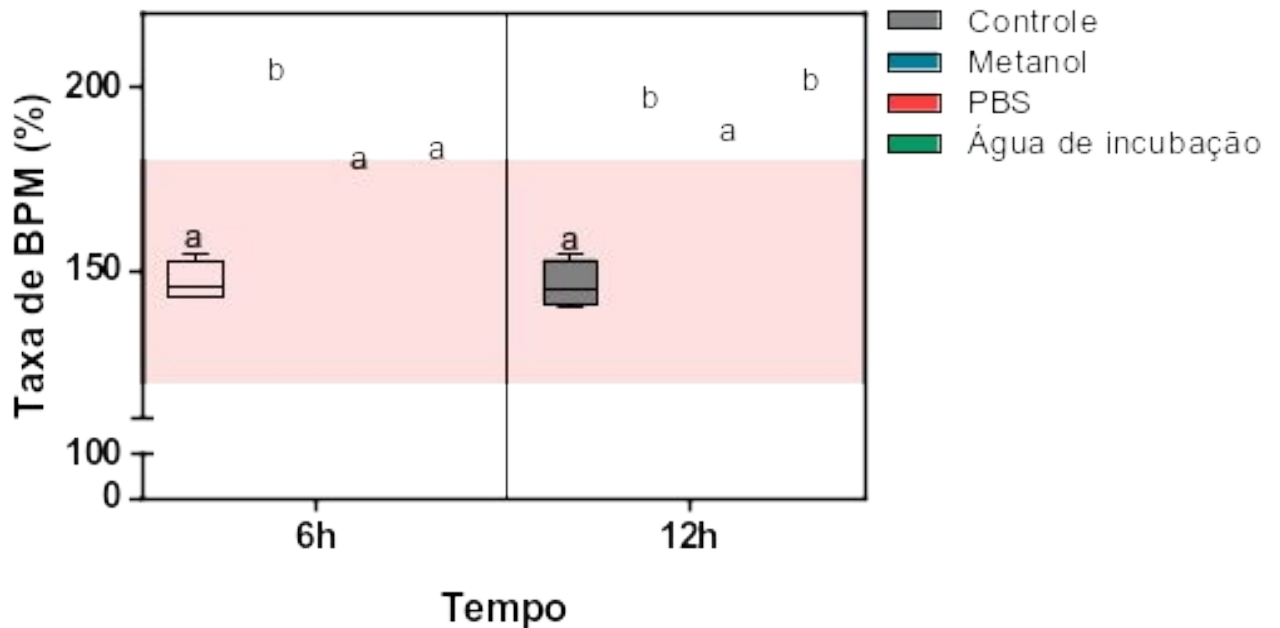
Embora o tratamento com PBS demonstre conservar os embriões após 6 h de resfriamento ($76,5\% \pm 8,5$), com resultados semelhantes ao grupo controle $91,5\% \pm 6,24$, observamos que após 12 h de resfriamento ocorreu uma diminuição na taxa de eclosão. Observou-se que um meio salino, como o PBS, não é o mais indicado para longos períodos de resfriamento. O PBS até pode ser útil em pequenas distâncias de transporte dos embriões, considerando que a uma alternativa seria o uso do metanol, que é um crioprotetor de alta permeabilidade e toxicidade aos embriões (Rocha et al., 2018). No trabalho desenvolvido por Lahnsteiner *et al.*, 2009, as soluções salinas tamponadas testadas resultaram em uma boa relação de tempo de manutenção e taxa de eclosão, podendo chegar até mesmo 30 horas de resfriamento. Porém, os resultados obtidos demonstram que soluções salinas preservaram melhor os embriões em estágio de desenvolvimento mais avançado. Os embriões com 50% de epibolia submetidos à solução salina tamponada (PBS) não suportaram o estresse osmótico, por consequência dos tecidos menos desenvolvidos e alta permeabilidade do córion nesta fase do desenvolvimento (Zhang et al., 1997).

5.2 Taxa de Batimento Cardíaco por Minuto (BPM)

A taxa de batimento cardíaco mostra-nos que o tratamento com metanol acelerou o batimento cardíaco dos embriões tanto em 6h de resfriamento ($193,5\% \pm 9,21$), quanto 12 horas de resfriamento ($190,2\% \pm 2,73$), enquanto os demais tratamentos não apresentaram diferença estatística demonstrando a faixa espectral de naturalidade do animal. Quando expomos os embriões de zebrafish a concentrações baixas de crioprotetor por períodos mais curtos de tempo a

toxicidade e teratogênias resultantes são menores (Zhang et al., 1993), assim como tempos prolongados de exposição acarretam a aceleração da taxa metabólica.

Figura 04. Taxa de Batimento Cardíaco por minuto.



Fonte: Elaborado por Fabris, 2023.

Figura 04. Avaliação do batimento cardíaco por minuto das larvas de *Danio rerio*. A faixa rosa representa os padrões normais de batimento, indo de 120 a 180bpm (DE LUCA et al., 2014). Letras minúsculas distintas (*ab*) indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$). Kruskal-wallis $p = 0,0009$. Teste múltiplo comparação de médias Dunn.

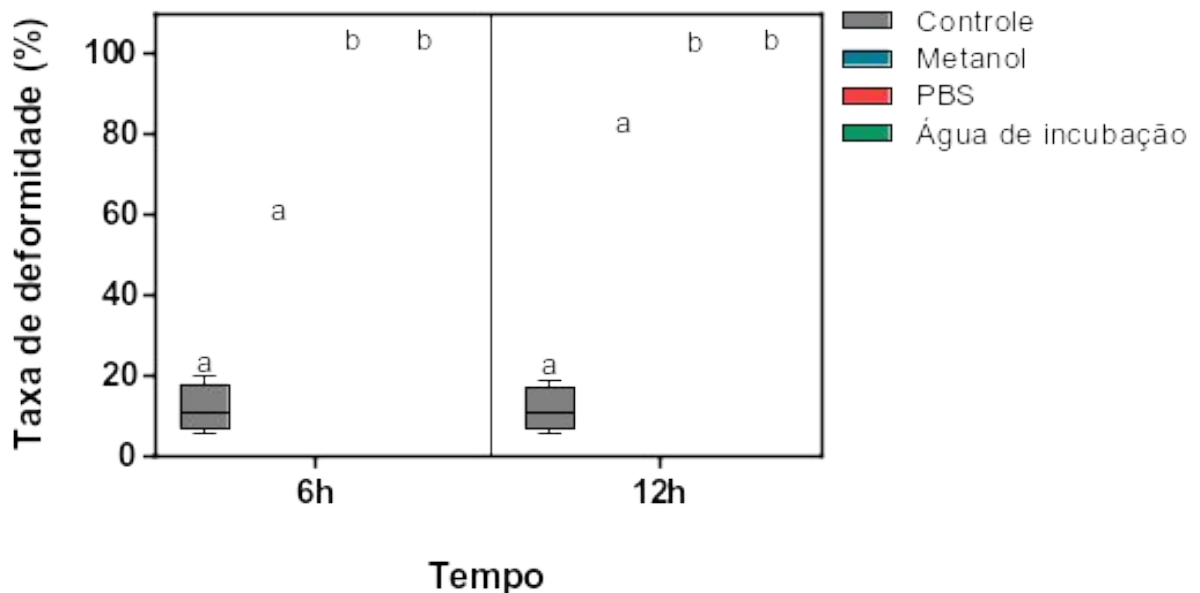
* o tratamento 24h não apresentou eclosão

Como o tratamento do trabalho realizado é de somente 1M de Metanol esperava-se que não houvesse alterações, porém os tempos utilizados durante o trabalho ultrapassaram 30 minutos de exposição ao crioprotetor, mesmo ocorrendo lavagens, o que levou ao aumento da frequência cardíaca larval.

5.3 Taxa de Deformidade

Podemos observar que o gráfico abaixo demonstra uma menor taxa de deformidade no tratamento contendo metanol tanto em 6h (36,71% \pm 14,86), quanto em 12h (61,76% \pm 14,8) em comparação com os outros tratamentos associados ao controle, assim como o trabalho de Kopeika et al., 2006 que realizou micro-injeções de crioprotetor interno e externo (Metanol e Sacarose) nos embriões de Zebrafish, resultando um crescimento sem deformidades morfológicas pós-resfriamento, sendo um método mais invasivo do que a exposição para difusão.

Figura 05. Taxa de Deformidade.



Fonte: Elaborado por Fabris, 2023.

Figura 05. Taxa de deformidade morfológica das larvas de *Danio rerio* resfriados por 24 horas em três soluções. Letras minúsculas distintas (*ab*) indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$). Kruskal-wallis $p = 0,0002$. Teste múltiplo comparação de médias Dunn.

* o tratamento 24h não apresentou eclosão

Quando avaliamos os trabalhos de Liu *et al.*, (1999), Desai *et al.*, (2015) e Paes *et al.*, (2017), uma das dificuldades na execução dos trabalhos é em questão da baixa resistência dos embriões às baixas temperaturas. Os tratamentos contendo água de incubação e PBS apresentaram maiores taxas de teratogenia

devido à falta de proteção às baixas temperaturas do resfriamento, o que também causou danos as células quando reaquecidas para retornar ao desenvolvimento embrionário e o estresse osmótico. Esse resultado foi corroborado por Lahnsteiner et al., 2009, onde embriões com 5 somitos tiveram menor resistência ao resfriamento em comparação aos estágios mais avançados do desenvolvimento. Em estágios de menor desenvolvimento, o dano causado pelo resfriamento foi muito mais severo, como relatou o autor. Podemos observar a Figura 06 abaixo demonstrando as teratogênias observadas.

Figura 06. Teratogênias demonstradas em PBS (C) e Água e Incubação (D).

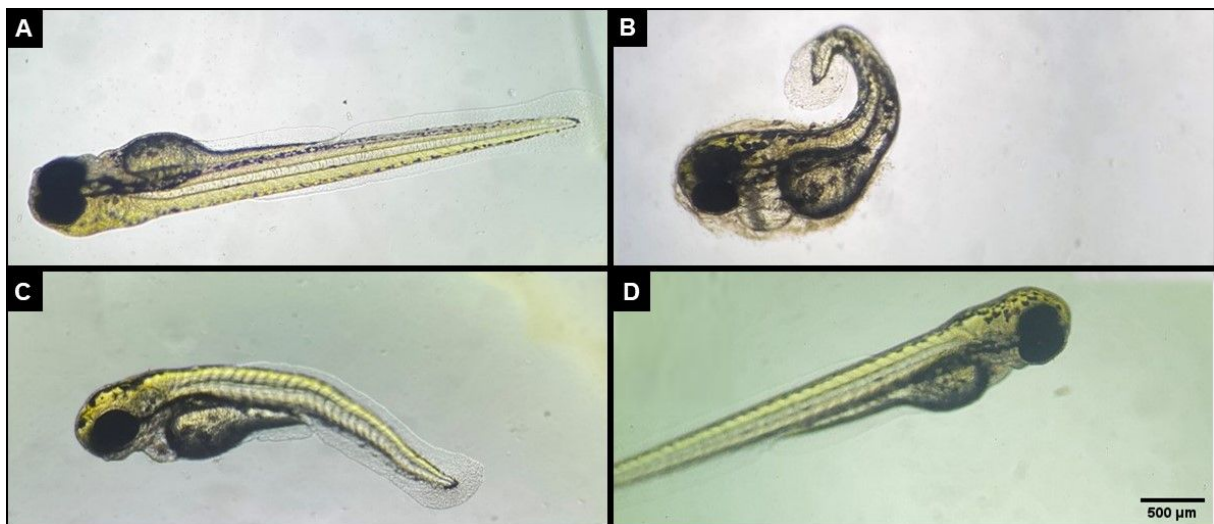


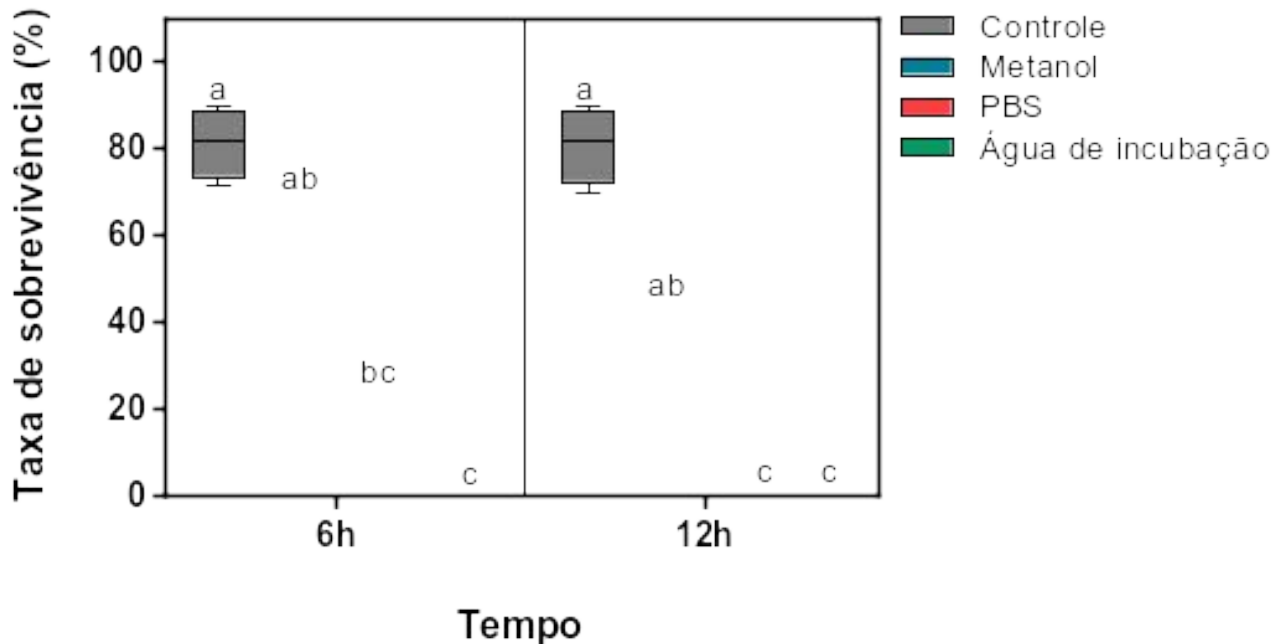
Figura 06. Imagem de deformidade morfológica das larvas de zebrafish (*Danio rerio*) resfriados por até 24 horas em três soluções. Larva normal, tratamento controle/ fresco (A). Teratogênias identificadas em larvas de zebrafish no tratamento água de incubação (B) e PBS (C) e larva com características morfológicas normais expostas ao tratamento 1M metanol + 0,1 m sacarose (D). Todas as análises foram realizadas em 96 horas pós-fertilização (hpf).

5.4 Taxa de Sobrevivência

A sobrevivência observada pelo tratamento contendo metanol não possui diferença estatística em relação ao controle após 6 horas e 12 horas de resfriamento, trazendo-nos a informação de que o tratamento é eficaz na

preservação dos embriões durante o período de resfriamento em 50% epibolia.

Figura 07. Taxa de Sobrevivência.



Fonte: Elaborado por Fabris, 2023.

Figura 06. Taxa de sobrevivência das larvas de *Danio rerio* resfriados por 24 horas em três soluções. Letras minúsculas distintas (*abc*) indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$). Kruskal-wallis $p = 0,0002$. Teste múltiplo comparação de médias Dunn.

* o tratamento 24h não apresentou eclosão

Os resultados obtidos na taxa de sobrevivência do grupo 1 M Metanol + 0,1 M Sacarose, PBS e Água de Incubação são as consequências das outras análises realizadas – taxa de eclosão, taxa de batimento cardíaco e taxa de deformidade. Demonstrando que as larvas que conseguiram resistir e desenvolver-se 15 dias após o resfriamento foram aquelas que apresentaram o menor índice de desenvolvimento de teratogênias causadas pelo resfriamento, resultando em condições favoráveis ao desenvolvimento do movimento da alimentação na fase da abertura do boca, o que resultou na condição da não deformidade, em maioria impediu a alimentação, levando a uma grande mortalidade. O PBS e Água de Incubação desenvolveram altas taxas de deformidade, muitas teratogênias conhecidas da literatura como edema de pericárdio e lordose. Ocasionalmente a falta

de mobilidade larval e, por consequência, a falta do movimento de alimentação, o que levou a morte larval nos tratamentos.

5.5 Retardo do desenvolvimento embrionário pelo resfriamento

Durante o trabalho foi observado que o tratamento contendo 1M Metanol com adição de 0,1M Sacarose obteve, em comparação aos tratamentos PBS e Água de Incubação, um desenvolvimento mais veloz. Com duas horas de aceleração no desenvolvimento embrionário, enquanto os tratamentos PBS e Água de Incubação apresentaram um retardo de três horas em comparação ao controle. A aceleração do batimento cardíaco das larvas ocasionado pela exposição por longos períodos ao crioprotetor (Zhang et al., 1993), ergue consigo a taxa metabólica, causando o rápido desenvolvimento embrionário. Enquanto os períodos de resfriamento afetaram PBS e Água de Incubação que não conseguiram diminuir o retardo do desenvolvimento embrionário. Necessitam-se de estudos que relatem as consequências nos animais adultos, gerados do processo de resfriamento, quando expostos às condições de armazenagem em crioprotetor.

6 CONCLUSÃO

Observamos que é possível a otimização do protocolo de resfriamento de embriões de zebrafish quando utilizamos um meio com 1M Metanol na adição de 0,1M Sacarose em até 12 horas sem a perda de qualidade da linhagem, tendo bons efeitos quanto à um relevante taxa de eclosão e baixa de deformidade. O protocolo pode ser utilizado como peça fundamental para comercialização/compartilhamento de linhagens genéticas específicas de zebrafish auxiliando na pesquisa farmacológica e avanço da pesquisa científica. O trabalho realizado abre portas para estudos que podem ser realizados visando produzir novas tecnologias para o transporte econômico e viável e embriões de peixes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARASHIRO, D. R., YASUI, G. S., CALADO, L. L., NASCIMENTO, N. F. D., SANTOS, M. P. D., ALVES DO SANTOS, S. C., SENHORINI, J. A. Synchronizing developmental stages in Neotropical catfishes for application in germ cell transplantation. **Zygote**, 26(2), 135-148, 2018.

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, p.1409-1422, 2003.

ANDRADE, F. F., MAKRAKIS, M. C., LIMA, A. F. D., ASSUMPÇÃO, L. D., MAKRAKIS, S., PINI, S. F. Desenvolvimento embrionário, larval e juvenil de *Hemisorubim platyrhynchos* (Siluriformes, Pimelodidae) da bacia do rio Paraná. Iheringia. **Série Zoologia**, 104(1), 70-80: 2014.

BART, A. New approaches in cryopreservation of fish embryos. In: TIERSCH, T. R., MAZIK, P. M. Cryopreservation in aquatic species. **Batou Rouge: World Aquaculture Society**, p. 179-187, 2000.

BARTON, Carrie L.; BAUMANN, Diana P.; COX, James D. Export and transportation of zebrafish. In: **The Zebrafish in Biomedical Research**. Academic Press, 2020. p. 443-450.

BEST, BENJAMIN P. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. **Rejuvenation research**, v. 18, n. 5, p. 422-436, 2015.

BIORENDER (2020). **Zebrafish Developmental Timeline**. Disponível em: <https://app.biorender.com/biorender-templates/t-5e5d7ebdea0faa0088227dee-zebrafish-developmental-timeline>.

CHARAN, JAYKARAN; KANTHARIA, N. D. How to calculate sample size in animal studies? **Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics**, v. 4, n. 4, p. 303, 2013.

CONCEA. Resolução nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. Dispõe sobre procedimentos de eutanásia realizados em animais incluídos em atividades de ensino ou de pesquisa científica. In: **Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações: Legislação CONCEA**. Seção 9.7.8.5., p. 39.

CONNOLLY, MICHELLE H.; HALL, BRIAN K. Embryonic heat shock reveals latent hsp90 translation in zebrafish (*Danio rerio*). **International Journal of Developmental Biology**, v. 52, n. 1, p. 71-79, 2003.

COSTA, P. M.; CAEIRO, S.; COSTA, M. H. Multi-organ histological observations on juvenile *Senegalese soles* exposed to low concentrations of waterborne cadmium. **Fish physiology and biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 143-158, 2013.

COUTINHO, C.I.N. Manutenção e reprodução em peixe zebra (*Danio rerio*) - Relatório final de estágio no Biotério de Organismos Aquáticos do CIIMAR. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, 2018.

DE LUCA, Elisa et al. ZebraBeat: a flexible platform for the analysis of the cardiac rate in zebrafish embryos. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 4898, 2014.

DESAI, K., SPIKINGS, E., RAWSON, D. M., ZHANG, T. Studies on impact of chilling on sox gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Cryobiology**, 2010.

DESAI, KUNJAN; SPIKINGS, EMMA; ZHANG, TIANTIAN. Effect of chilling on sox2, sox3 and sox19a gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Cryobiology**, v. 63, n. 2, p. 96-103, 2011.

DIMAYER M. Influência da baixa temperatura e diferentes crioprotetores em oócitos e embriões de *Colossoma macropomum* e *Piaractus brachypomus*. 2013. 48f. **Tese (Doutorado em Zootecnia)** - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 2013.

DOS ANJOS, HÉLIO DANIEL BELTRÃO; DOS ANJOS, CHRIS ROCHA. Biologia reprodutiva e desenvolvimento embrionário e larval do cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi Schultz*, 1956 (Characiformes: Characidae), em laboratório. **Boletim do Instituto de Pesca**, Sao Paulo,32.2: 151-160,2006.

ESCALEIRA, R. O Zebrafish (*Danio rerio*). **Revista Arquivos Brasileiros de Medicina Naval**, 78(1), 43-48,2017.

FARAGÓ, B., KOLLÁR, T., SZABÓ, K., BUDAI, C., LOSONCZI, E., BERNÁTH, G., CSEREPES, J. Stimulus-triggered enhancement of chilling tolerance in zebrafish embryos. **PLoS One**, v. 12, n. 2, p. e0171520, 2017.

FISHMAN, Mark C. Zebrafish – The Canonical Vertebrate. **Science**, v. 294, no. 5545, p. 1290-1291, 2001.

FORNARI, Darci Carlos et al. Crioprotetores para o resfriamento de embriões de piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p. 2809-2816, 2014.

GERLAI, ROBERT; LEE, VALLENT; BLASER, RACHEL. Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*). **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 85.4: 752-761: 2006.

GODINHO, A. L., GODINHO, H. P. Breve visão do São francisco. Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Belo Horizonte: **PUC Minas**, 468, 15- 23, 2003.

HAGEDORN, M., KLEINHANS, F. W., WILDT, D. E., RALL, W. F. Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. **Cryobiology**, 34(3), 251-263, 1997.

HIGAKI, S., KAWAKAMI, Y., ETO, Y., YAMAHA, E., NAGANO, M., KATAGIRI, S. & TAKAHASHI, Y. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by vitrification of yolk-intact and yolk-depleted embryos using various cryoprotectant solutions. **Cryobiology**, 67(3), 374-382, 2013.

HOAGE, Tiffany; DING, Yonghe; XU, Xiaolei. Quantificação das funções cardíacas em peixes-zebra embrionários e adultos. **Desenvolvimento cardiovascular: métodos e protocolos** , p. 11-20, 2012.

HOLMBERG, ANNA; OLSSON, CATHARINA; HOLMGREN, SUSANNE. The effects of endogenous and exogenous nitric oxide on gut motility in zebrafish *Danio rerio* embryos and larvae. **Journal of experimental biology**, v. 209, n. 13, p. 2472- 2479, 2006.

KIMMEL, C.B.; BALLARD, W.W.; KIMMEL, S.R.; ULLMANN, B.; SCHILLING, T.F. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. **Developmental Dynamics**, v.203, p.253-310, 1995.

KHOSLA, Kanav et al. Gold nanorod induced warming of embryos from the cryogenic state enhances viability. **ACS nano**, v. 11, n. 8, p. 7869-7878, 2017.

KOPEIKA, Julia; ZHANG, Tiantian; RAWSON, David. Embriões de zebrafish (*Danio rerio*) usando microinjeção. **CryoLetters** , v. 27, n. 5, pág. 319-328, 2006.

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

LAHNSTEINER, F. Factors affecting chilled storage of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, v. 72, n. 3, p. 333-340, 2009.

LAHNSTEINER, F. Limitations for prolonged chilled storage of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Aquaculture Research**, v. 42, n. 2, p. 288-295, 2011.

LIN, CHUN CHI; HUI, MICHELLE NY; CHENG, SHUK HAN. Toxicity and cardiac effects of carbaryl in early developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 222, n. 2, p. 159-168, 2007.

LIN, C., SPIKINGS, E., ZHANG, T., RAWSON, D. M. Effect of chilling and cryopreservation on expression of Pax genes in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and blastomeres. **Cryobiology**, 59(1), 42-47, 2009.

LIU, XIANG-HONG; ZHANG, TIANTIAN; RAWSON, DAVID M. The effect of partial removal of yolk on the chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Cryobiology**, v. 39, n. 3, p. 236-242, 1999.

LIU, X. H.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Effect of cooling rate and partial removal of yolk on the chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, v. 55, n. 8, p. 1719-1731, 2001.

LUZ, R. K., REYNALTE-TATAJE, D. A., FERREIRA, A. A., ZANIBONI-FILHO, E. Desenvolvimento embrionário e estágios larvais do mandi-amarelo *Pimelodus maculatus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, 27(1), 55-55, 2018.

MAXIMINO, C., PUTY, B., MATOS OLIVEIRA, K. R., & HERCULANO, A. M. Behavioral and neurochemical changes in the zebrafish leopard strain. **Genes, Brain and Behavior**, 12(5), 576-582, 2013.

MARA L, CASU S., CARTA A., DATTENA M. Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. **Animal Reproduction Science**. 2013;138(1–2):25–38, 2013.

MAZUR, P. The role intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology**, San Diego, v. 14, n. 3, p. 251-272, 1977.

MAIOLINO, CAMILA VALENTE. **desenvolvimento inicial do crânio-mandíbula de *Rhamdia quelen* (siluriformes: heptapteridae)** Monografia :Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2009.

MELO, F. C. S. A.; GODINHO, H. P. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. **Animal Reproduction (AR)**, 3.3: 380-385,2018.

MOTHÉO, Stéphanie Ferguson. Utilização de zebrafish para validação de programa computacional aplicado à análise cardíaca após administração de medicamentos cardiotônicos. 2020.

MUSHTAQ MY, VERPOORTE R, KIM HK. Zebrafish as a model for systems biology. **Biotechnol Genet Eng Rev.** 29:187-205: 24568280, 2013.

NEMTSAS, Petros et al. Coração de zebrafish adulto como modelo para o coração humano? Um estudo eletrofisiológico. **Jornal de cardiologia molecular e celular** , v. 48, n. 1, pág. 161-171, 2010.

NEVES, P. R. Utilização de crioprotetores intra e extracelulares em embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). 2008. 71p. **Tese** (Doutorado em Zootecnia). Programa de Pós-graduação em Zootec da Universidade Estadual de Maringá - Área de concentração Produção Animal: Maringá – 2008.

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, v.1, p.109-124, 1991.

NUREDDIN, A.; EPSAROS, E.; KIESSLING, A.A. Purines inhibit the development of mouse embryos *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.90, p.455-464, 1990.

PARNPAI R, LIANG Y, KETUDAT-CAIRNS M, SOMFAI T, NAGAI T. Vitrification of buffalo oocytes and embryos. **Theriogenology.** ;86(1):214–220, 2016.

PAE, FARIA; DO CARMO, MARIA; OKADA NAKAGHI, LAURA SATIKO. Post-cooling survival, growth and deformity rates in zebrafish embryos (*Danio rerio*). **Zygote**, p. 76-88, 2017.S

PEREIRA, Liliane Veras Leite-Castro. Conservação de gametas e embriões de peixes teleósteos. 2015.

RIBAS, Laia; PIFERRER, Francesc. The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. **Reviews in Aquaculture**, v. 6, n. 4, p. 209-240, 2014.

ROCHA, Olivia Basso et al. Crioprotetores e embriotoxicidade em Zebrafish (*Danio rerio*). 2018.

ROBLES, V., CABRITA, E., DE PAZ, P., CUNADO, S.; ANEL, L., HERRÁEZ, M.P. Effect of a vitrification protocol on the lactate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities and the hatching rates of Zebrafish (*Danio rerio*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos. **Theriogenology**, Los Altos, v. 61, n. 7-8, p. 1367- 1379, 2004.

SIMONETTI, R. B., MARQUES, L. S., STREIT JR, D. P., OBERST, E. R. Zebrafish (*Danio rerio*): The future of animal model in biomedical research. **Journal of Fisheries Sciences**, v. 9, n. 3, p. 39, 2015.

SMITH, C.L.; PETER, A.T.; PUGH, D.G. Reproduction in llamas and alpacas: A review. **Theriogenology**, v.41, p.573-592, 1994.

SMORAG, Z.; GAJDA, B.; WIECZOREK, B.; JURA, J. Stage-dependent viability of vitrified rabbit embryos. **Theriogenology**, v.6, p.1227-1231, 1989.

STRECKER, R., SEILER, T. B., HOLLERT, H., & BRAUNBECK, T. Oxygen requirements of zebrafish (*Danio rerio*) embryos in embryo toxicity tests with environmental samples. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 3, p. 318-327, 2011.

STREIT Jr., D. P.; DIGMAYER, M.; RIBEIRO, R. P. Embriões de pacu submetidos diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.8, p.1199-1202, 2007.

SUZUKI, T., KOMADA, H., TAKAI, R., ARII, 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.

TIAN, S., TENG, M., MENG, Z., YAN, S., JIA, M., LI, R., ZHU, W. Toxicity effects in zebrafish embryos (*Danio rerio*) induced by prothioconazole. **Environmental Pollution**, 255, 113269, 2019.

WEBER, P.K.; YOUNGS, C.R. Investigation of cryoprotectant toxicity to oricine embryos. **Theriogenology**, v.41, p.1291-1298, 1994.

ZHANG, T.; RAWSON, David M.; MORRIS, G. John. Criopreservação de embriões pré-eclosão de zebrafish (*Brachydanio rerio*). **Recursos Aquáticos Vivos**, v. 6, n. 2, pág. 145-153, 1993.

ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology**, v. 32, n. 3, p. 239-246, 1995.

ZHANG, TIAN TIAN; LIU, XIANG-HONG; RAWSON, DAVID M. Effects of methanol and developmental arrest on chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, v. 59, n. 7, p. 1545-1556, 2003.