

# Índice

<b>Introdução.....</b>	1
1. Criobiologia: um desafio do século XXI.....	1
2. Princípios da Criopreservação de Sistemas Vivos.....	2
2.1. Formação de gelo extracelular e intracelular.....	2
2.2. Fenómenos físico-químicos que ocorrem durante o descongelamento.....	3
2.3 Velocidades de congelação e descongelação.....	4
3. Agentes Crioprotectores (CPAs) .....	5
4. Proteínas Anticongelantes (AFPs): crioprotectores de origem natural.....	6
4.1. Mecanismos de acção das proteínas anticongelantes.....	8
4.2. Papel das proteínas anticongelantes AFPs na criopreservação.....	8
5. Criopreservação de Embriões de Teleósteos.....	10
5.1. Caracterização de embriões de Teleósteos.....	11
5.2. Congelação Lenta e Controlada <i>versus</i> Vitrificação na criopreservação de embriões.....	12
5.3. Factores que limitam o sucesso da criopreservação de embriões de peixes.....	14
5.4. Técnicas que possibilitam o aumento da permeabilidade aos crioprotectores.....	15
5.4.1. Permeabilização.....	15
5.4.2. Microinjecção.....	16
5.4.3. Electroporação.....	17
6. Alternativa à Criopreservação de Embriões: Criopreservação de Blastómeros.....	18
7. Espécies modelo na criopreservação de embriões de Teléosteos.....	20
Dourada ( <i>Sparus aurata</i> ) .....	20
Peixe Zebra ( <i>Danio rerio</i> ) .....	21
<b>Objectivo.....</b>	22
<b>Material e Métodos.....</b>	23
Parte I: Microinjecção de AFP I em embriões de <i>S. aurata</i> : estudos de toxicidade, distribuição e resistência a baixas temperaturas.....	23
Determinação da viabilidade embrionária após microinjecção de AFP I.....	26
Estudo do efeito da proteína AFP I na resistência embrionária ao frio.....	27
Distribuição da proteína por microscopia confocal.....	29

Parte II: Criopreservação de blastómeros de <i>D. rerio</i> .....	31
Criopreservação de blastómeros.....	33
Análise da incorporação da proteína por microscopia de fluorescência.....	34
Análise de dados e estatística.....	35
<b>Resultados</b> .....	36
Parte I: Microinjeção de AFP I em embriões de <i>S. aurata</i> : estudos de toxicidade, distribuição e resistência a baixas temperaturas.....	36
Determinação do volume adequado de microinjeção.....	36
Determinação da viabilidade embrionária após microinjeção de AFP I.....	37
Estudo do efeito da proteína AFP I na resistência embrionária ao frio.....	38
Toxicidade do crioprotector tradicional 3M DMSO.....	39
Avaliação da resistência embrionária de <i>S. aurata</i> .....	42
Distribuição da proteína por microscopia confocal.....	44
Parte II: Criopreservação de blastómeros de <i>D. rerio</i> .....	45
Estudo do efeito tóxico do crioprotector tradicional 2M DMSO e da proteína anticongelante AFP I .....	45
Estudo da viabilidade celular dos blastómeros criopreservados.....	46
Distribuição da proteína por microscopia de fluorescência.....	48
<b>Discussão</b> .....	49
Parte I: Microinjeção de AFP I em embriões de <i>S. aurata</i> : estudos de toxicidade, distribuição e resistência a baixas temperaturas.....	49
Parte II: Criopreservação de blastómeros de <i>D. rerio</i> .....	60
<b>Conclusões</b> .....	64
<b>Referencias Bibliográficas</b> .....	65
<b>Apêndice: Publicação</b> .....	79
<b>Anexos</b>	