



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE
FOLÍCULOS OVARIANOS DE PEIXES USANDO VITRIFICAÇÃO**

LEANDRO CESAR DE GODOY

Porto Alegre (RS)
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE
FOLÍCULOS OVARIANOS DE PEIXES USANDO VITRIFICAÇÃO**

LEANDRO CESAR DE GODOY
Zootecnista/UEM
Mestre em Aquicultura/FURG

Tese apresentada como um dos
requisitos à obtenção do Grau
de Doutor em Zootecnia - Área
de Concentração: Produção
Animal.

Porto Alegre (RS), Brasil
Agosto de 2012

CIP - Catalogação na Publicação

Godoy, Leandro Cesar de
Desenvolvimento de protocolo para criopreservação
de folículos ovarianos de peixes usando vitrificação /
Leandro Cesar de Godoy. -- 2012.
114 f.

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.
Coorientadoras: Tiantian Zhang, Adriana Bos-
Mikich.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Gameta de peixe. 2. Genoma materno. 3.
Mitocôndria. 4. Criobanco. 5. Programa de reprodução.
I. Streit Jr, Danilo Pedro, orient. II. Zhang,
Tiantian, coorient. III. Bos-Mikich, Adriana,
coorient. IV. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

LEANDRO CESAR DE GODOY
Zootecnista e
Mestre em Aquicultura

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOCTOR EM ZOOTECNIA

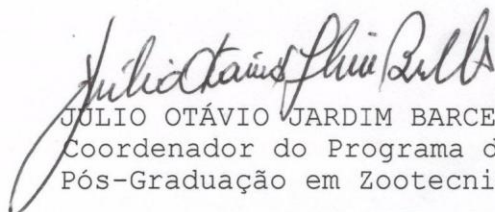
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 24.08.2012
Pela Banca Examinadora

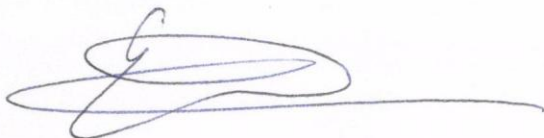
Homologado em: 13.08.2012
Por



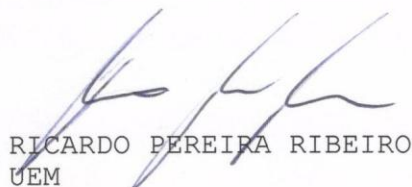
DANILO PEDRO STREIT JÚNIOR
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientador



JULIO OTÁVIO JARDIM BARCELLOS
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia



EVOY ZANIBONI FILHO
UFSC



RICARDO PEREIRA RIBEIRO
UEM



CLARICE BERNHARDT FIALHO
UFRGS



PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de
Agronomia

“Aos meus pais, pelos valores ensinados, pelo amor e apoio incondicional para alcançar o que um dia foi um sonho, e hoje se torna realidade”

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, e principalmente por me dar os pais maravilhosos que tenho. Obrigado pai, obrigado mãe, pela excelente educação, por me ensinarem valiosos princípios e valores humanos, pela ajuda incondicional, mesmo em momentos de grande dificuldade financeira, eu jamais teria conseguido sem vocês!

Ao Prof. Danilo P. Streit Jr, pela orientação, incentivo, demonstração de respeito e confiança no meu trabalho, apoiando ao longo dos anos iniciais do doutorado e principalmente na decisão de sair do país para realizar o doutorado sanduíche.

A minha co-orientadora Prof^a Adriana Bos-Mikich, pelo apoio e grande estímulo para aprofundar os conhecimentos na área de criobiologia.

A minha orientadora no exterior, Prof^a Tiantian Zhang, pelos ensinamentos ao longo desses 12 meses na Inglaterra, pelo exemplo de pesquisadora e ser humano, o qual sempre buscarei seguir.

A toda a equipe do LIRANS Institute of Research in the Applied Natural Sciences, em especial a Dr^a Tiziana Zampolla, pelo conhecimento compartilhado, pelos ensinamentos sobre gestão de laboratório, técnicas/metodologias, sem os quais eu não teria conduzido este projeto.

Aos amigos britânicos que conquistei ao longo deste um ano: Pauline, Sue, Jason, Richard & Mary, Des & Sandie, Paul & Sarah, Peter & Nora. Obrigado por me acolherem, por me fazer sentir “*at home*”, pelos maravilhosos momentos compartilhados, muitas risadas, almoços, jantares, passeios, aprendizado sobre a cultura britânica, momentos que certamente jamais esquecerei.

Aos amigos e membros do Grupo Aquam, em especial ao Luis, Fernanda, Nívia, Diego, Raquel e Maira, pela amizade, apoio e crescimento em conjunto.

As amigas de longa data Michele, Ellen e Adriana, que mesmo separados por milhares de quilômetros ou até um oceano, sempre se fazem presente, essas são daqueles amigos pra uma vida toda.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado no país e especialmente a CAPES, pela bolsa de doutorado sanduíche no exterior, proporcionando-me não apenas uma qualificação científica, mas acima de tudo uma experiência de vida.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho, meu carinho, reconhecimento e gratidão.

*“Aprendi que o sucesso deve ser medido não tanto pela posição que alguém alcança na vida, mas sim pelos obstáculos que teve que superar enquanto tentava alcançá-lo”
(Booker T. Washington)*

¹DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS DE PEIXES USANDO VITRIFICAÇÃO

Autor: Leandro Cesar de Godoy
Orientador: Danilo Pedro Streit Júnior
Co-orientadora: Adriana Bos-Mikich
Orientadora no exterior: Tiantian Zhang

Resumo

A criopreservação de embriões de peixes vem sendo investigada há mais de duas décadas, no entanto todos os protocolos testados até o momento falharam. A utilização de oócitos, mais recentemente, foi relatada como uma alternativa, no entanto, a maioria dos estudos foram realizados utilizando uma única técnica - o congelamento lento controlado - não alcançando nenhum êxito. A vitrificação é um método de criopreservação livre de gelo, apresentando diversas vantagens que podem contribuir para superar algumas das dificuldades relacionadas com a criopreservação de oócitos de peixes. No presente estudo desenvolveu-se um protocolo de vitrificação para folículos ovarianos de zebrafish em estágio III. Uma série de crio-soluções foram formuladas e testadas quanto à sua capacidade de vitrificação empregando diferentes dispositivos (palheta plástica, bloco de vitrificação e fibreplugTM). A toxicidade das soluções de vitrificação foi avaliada através da análise de integridade da membrana dos folículos ovarianos utilizando coloração com *trypan blue*. Além disso, foi investigado o efeito do protocolo de vitrificação sobre os folículos em nível sub-celular, através da medição da concentração de ATP citoplasmático e da distribuição e atividade mitocondrial, utilizando sonda fluorescente JC-1 e microscopia confocal. Após a vitrificação, os folículos ovarianos apresentaram integridade de membrana de $59,9 \pm 18,4\%$ quando o fibreplug e a solução V₁₆ (1.5 M metanol + 4.5 M propileno glicol) foram empregados. Quando vitrificados em V₂ (1.5 M metanol + 5.5 M DMSO) a integridade de membrana diminuiu para $42,0 \pm 21,0\%$. Observou-se que os folículos localizados no meio do fragmento foram mais protegidos de injúrias apresentando satisfatória aparência quanto a sua morfologia mesmo 2 h após o aquecimento. A integridade mitocondrial das células da camada da granulosa foi claramente prejudicada pelo protocolo de vitrificação e o nível de ATP nos folículos diminuiu significativamente ($P < 0,05$) após o aquecimento. A vitrificação de folículos ovarianos de zebrafish em estágio III e seu efeito em nível de subcelular são relatados aqui pela primeira vez. As informações obtidas a partir deste estudo serão muito úteis para guiar o desenvolvimento e otimização de um protocolo para a criopreservação de oócitos de peixes no futuro.

Palavras-chave: gameta de peixe; genoma materno; criobanco; mitocôndria.

¹ Tese de Doutorado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (114 p.) Agosto, 2012.

²DEVELOPMENT OF CRYOPRESERVATION PROTOCOL FOR FISH OVARIAN FOLLICLES USING VITRIFICATION

Author: Leandro Cesar de Godoy
Supervisor: Danilo Pedro Streit Júnior
Co-supervisor: Adriana Bos-Mikich
Supervisor in abroad: Tiantian Zhang

Abstract

Cryopreservation of fish embryos has been under investigation for over two decades; however every protocol tested so far has failed. The use of oocytes has more recently been reported as an alternative, nevertheless most of the studies were carried out using a single technique - controlled slow cooling - and success also remains elusive. Vitrification is an ice-free cryopreservation method which offers several advantages that may contribute to overcome some of the difficulties involved with fish oocytes cryopreservation. In the present study we developed a vitrification protocol for stage III zebrafish ovarian follicles in ovarian tissue fragments. A series of cryo-solutions were designed and tested for their vitrifying ability using different devices (plastic straw, vitrification block and fibreplugTM). Toxicity of vitrification solutions was evaluated by assessing membrane integrity with trypan blue staining. In addition, we investigated the effect of vitrification protocol on the follicles at sub-cellular level by measuring the cytoplasmic ATP content and the mitochondrial distribution and activity using JC-1 probe and confocal microscopy. After vitrification, ovarian follicles showed membrane integrity of $59.9 \pm 18.4\%$ when fibreplug and V_{16} (1.5 M methanol + 4.5 M propylene glycol) solution were employed. When vitrified in V_2 (1.5 M methanol + 5.5 M DMSO) the membrane integrity decreased to $42.0 \pm 21.0\%$. We observed that follicles located in the middle of the fragments were more protected from injuries and some of them showed satisfactory morphological appearance even two hours post-warming. Mitochondria integrity of granulosa cells layer was clearly damaged by the vitrification protocol and ATP level in the follicles declined significantly ($P < 0.05$) after warming. Vitrification of stage III zebrafish follicles in ovarian tissue fragments and its effect at sub-cellular level is reported here for the first time. Information gained from this study will be very useful to guide development of a successful protocol for cryopreservation of fish oocytes in the future.

Keywords: Fish gamete; maternal genome; cryobanking; mitochondria.

² Doctoral Thesis in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (114 p.) August, 2012.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xi
CAPÍTULO I	
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. A vida em baixas temperaturas	4
2.2. Princípios de criobiologia	5
2.2.1. Dano celular em temperaturas hipotérmicas	6
2.2.2. Injúrias causadas pelo congelamento	6
2.3. Os crioprotetores	8
2.3.1. História	8
2.3.2. Crioprotetores permeáveis e não-permeáveis.....	10
2.3.3. Mecanismos de toxicidade dos crioprotetores.....	12
2.4. Técnicas de criopreservação	12
2.4.1. Congelamento lento controlado.....	12
2.4.1.1. Taxa de resfriamento	13
2.4.1.2. <i>Seeding</i>	13
2.4.1.3. Temperatura de mergulho em NL	14
2.4.1.4. Descongelamento	14
2.4.1.5. Remoção dos crioprotetores	15
2.4.2. Vitrificação	15
2.4.2.1. Taxa de resfriamento	16
2.4.2.2. Concentração dos crioprotetores	16
2.4.2.3. Vantagens e desvantagens da vitrificação	17
2.5. Criopreservação de gametas e embriões de espécies aquáticas	17
2.5.1. Obstáculos na criopreservação de embriões de peixes	19
2.5.2. A importância de um criobanco com genoma materno	20
2.5.3. Criopreservação de folículos ovarianos.....	20
2.6. Uso do zebrafish como espécie modelo	20

2.6.1. Informações gerais	20
2.6.2. Reprodução e estrutura ovariana	21
2.6.3. Desenvolvimento oocitário em zebrafish	21
3. OBJETIVOS, HIPÓTESES E ABORDAGEM PRETENDIDA.....	24

CAPÍTULO II - ARTIGO CIENTÍFICO

Abstract.....	29
1. INTRODUCTION.....	31
2. MATERIALS AND METHODS	33
2.1. Vitrifying tendency of single cryoprotectants	33
2.2. Vitrifying ability of vitrification solutions	35
2.3. Fish care and ovarian follicles collection.....	37
2.4. Toxicity of vitrification solutions.....	38
2.5. Vitrification of zebrafish ovarian follicles	39
2.6. Assessing ovarian follicles viability after vitrification	40
2.6.1. Membrane integrity assay	40
2.6.2. Measurement of cytoplasmatic ATP content	40
2.6.3. Mitochondrial integrity assay	41
2.6.4. Confocal microscopy	42
2.7. Statistical analysis	42
3. RESULTS	43
3.1. Vitrifying tendency of single cryoprotectants	43
3.2. Vitrifying ability of vitrification solutions	44
3.3. Toxicity of vitrification solutions.....	45
3.4. Viability of zebrafish ovarian follicles after vitrification.....	46
3.4.1. Membrane integrity	46
3.4.2. Cytoplasmatic ATP concentration in the ovarian follicles	48
3.4.3. Mitochondrial membrane potential and distribution	49
4. DISCUSSION.....	51
Acknowledgements	57
References.....	58
CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
APÊNDICES	
1. Relação dos químicos utilizados nos experimentos	80
2. Certificado apresentação oral no World Aquaculture 2011	81
3. Student Travel Award da Society for Cryobiology 2012.....	82
4. Instruções para autores (Theriogenology)	83
VITA.....	99

LISTA DE TABELAS

Página

Capítulo II

Table 1	Concentrations of single cryoprotectants tested in the vitrification study.....	34
Table 2	Individual concentration of cryoprotectants (Mol/L) in each vitrification solution tested.....	36
Table 3	Minimum vitrifying concentration (Mol/L) of single cryoprotectant using different devices.....	43
Table 4	Vitrifying ability of the 24 vitrification solutions tested by using two different devices.....	45

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

	Página	
Fig. 1	Processo de cristalização de uma solução evidenciando as etapas de nucleação e crescimento de cristais de gelo em escala molecular (linha A) e celular (linha B).....	7
Fig. 2	Mecanismo de ação dos crioprotetores em escala molecular (linha A) e celular (linha B).....	11
Fig. 3	Estádios do desenvolvimento oocitário em zebrafish. (I) crescimento primário; (II) cortical-alveolar; (III) vitelogênese; (IV) maturação; e (V) maturo.....	21
Fig. 4	Representação do folículo ovariano durante a vitelogênese inicial em teleósteos. (Adaptado de Nagahama et al., 1983).....	23

Capítulo II

Fig. 1	Zebrafish ovarian tissue fragment containing immature ovarian follicles at late stage III used in the present study.....	38
Fig. 2	Membrane integrity of stage III zebrafish ovarian follicles after equilibration for 30 min at room temperature in 90% L-15 medium containing 1.5 M methanol followed by exposure to vitrification solutions for 3 min in a stepwise manner: 1.5 min [50%] + 1.5 min [100%].....	46

Fig. 3	Membrane integrity of stage III zebrafish ovarian follicles after vitrification in V ₁₆ , V ₂ and V ₂₁ solutions.....	47
Fig. 4	ATP concentration in stage III zebrafish ovarian follicles after vitrification.....	48
Fig. 5	Effect of vitrification on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and mitochondrial distribution in stage III zebrafish ovarian follicles.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATP	Adenosina trifosfato
CPAs	Crioprotetores
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E2	17 β Estradiol
FSH	Hormônio folículo estimulante
K ⁺	Potássio
M	Molar
min	Minuto
mm	Milímetro
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NL	Nitrogênio líquido
PVP	Polivinilpirrolidona
μ m	Micrômetro

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A importância dos recursos genéticos animais para a manutenção da vida selvagem, bem como para a produção agropecuária tem se tornado cada vez mais evidente nos últimos anos. Os estoques pesqueiros encontram-se globalmente ameaçados principalmente devido a sobrepesca e a poluição ambiental (IUCN, 2003; Darwall et al., 2008; Rawson et al., 2011). A aquicultura, conseqüentemente, tem se tornado uma atividade importante para a produção de alimentos de alta qualidade, a fim de atender à demanda crescente de proteína em âmbito mundial, e ao mesmo tempo protege as populações naturais da sobrepesca (FAO, 2011).

Programas de conservação para peixes selvagens e cultivados têm sido estabelecidos em todo o mundo, a fim de protegê-los da extinção (Reid & Hall, 2003; Rawson et al., 2011). A criopreservação do germoplasma aquático traz a possibilidade de preservar o genoma de espécies ameaçadas de extinção, aumenta a representação de animais geneticamente valiosos para fins de exploração aquícola e evita perdas genéticas por meio de doenças e catástrofes (Ballou, 1992; Hagedorn et al., 2012).

Para a maioria das espécies do planeta, a criopreservação de embriões em qualquer estágio de desenvolvimento ainda representa grandes desafios. De acordo com Saragusty & Arav (2011), enquanto milhares e milhares de nascimentos ocorreram após a transferência de embriões congelados em humanos, bovinos e camundongos, o sucesso é muito limitado para as demais, mesmo espécies estreitamente relacionadas.

Em peixes, a criopreservação de sêmen de diversas espécies incluindo salmonídeos, ciprinídeos, ciclídeos, silurídeos, acipenserídeos, anastomídeos e caracídeos está bem documentada (Blaxter, 1953; Billard et al., 1995; Tsvetkova et al., 1996; Caffey & Tiersch, 2000; Carolsfeld et al., 2003; Linhart et al., 2005; Tiersch, 2000; Thirumala et al., 2006; Tiersch et al., 2007; Streit Jr et al., 2008a, 2008b; Martínez-Páramo et al., 2009; Viveiros & Godinho, 2009), e o sêmen criopreservado tem sido utilizado para a reprodução de muitas espécies selvagens e de criação (Fornari et al., 2012). Todavia, a criopreservação de espermatozoides preserva apenas o genoma paterno e não é suficiente para a preservação da diversidade genética, que depende também do genoma de origem materna (Zhang et al., 2007). Tentativas de criopreservar embriões de peixes vêm sendo conduzidas ao longo das últimas três décadas, no entanto um protocolo bem sucedido para armazenamento a longo prazo ainda permanece inatingível (Harvey, 1983; Zhang et al., 1993; Zhang & Rawson, 1995, 1998; Hagedorn et al., 2000; Cabrita et al., 2003; Robles et al., 2005; Valdez et al., 2005; Edashige et al., 2006).

Os embriões de peixes, répteis, aves e anfíbios são multicompartimentalizados. Existem diversas barreiras que têm sido apontadas como um entrave para o sucesso na criopreservação de embriões de peixes: o elevado conteúdo de vitelo, o grande tamanho, a baixa permeabilidade das membranas que envolvem o embrião e a alta sensibilidade ao resfriamento (Rall, 1993; Ninhaus-Silveira et al., 2008; Neves et al., 2012).

Recentemente foi relatado (Tsai et al., 2009a) que a utilização de oócitos pode oferecer algumas vantagens quando comparada com os embriões de peixe, principalmente devido à ausência de um córion completamente formado, seu menor tamanho resultando em uma maior relação superfície/volume e maior permeabilidade de membrana, portanto, aumentando as possibilidades de uma criopreservação bem sucedida.

Embora vários estudos tenham sido realizados envolvendo a criopreservação de oócitos de peixes (Lubzens et al., 2003, 2004; Isayeva et al., 2004; Plachinta et al., 2004; Lubzens et al., 2005; Guan et al., 2008; Tsai et al., 2009a, 2009b), todos eles caem na utilização de uma única técnica - o protocolo de resfriamento lento controlado - e o sucesso permanece inatingível assim como para os embriões. Somente um único estudo, realizado por Guan et al. (2010) relata o uso da vitrificação para folículos ovarianos de zebrafish (*Danio rerio*), no entanto, a viabilidade dos folículos após a vitrificação (analisada apenas pela integridade de membrana) foi altamente comprometida.

Apesar do uso bem sucedido da técnica de vitrificação para a criopreservação de oócitos em humanos (Chen, 1986; Kuwayama et al., 2005; Almodin et al., 2010; Kim & Hong, 2011) e alguns mamíferos domésticos (Arav & Zeron, 1997; Vajta et al., 1998; Cai et al., 2005; Saragusty & Arav, 2011), a vitrificação de oócitos de peixes encontra-se praticamente inexplorada até o momento. A vitrificação é um método de criopreservação livre de gelo, usando altas concentrações de crioprotetores (CPAs) e taxas ultra-rápidas de resfriamento (Rall & Fahy, 1985), oferecendo vantagens que podem contribuir para superar algumas das dificuldades encontradas até agora com os protocolos de resfriamento lento.

O presente estudo teve como objetivo desenvolver um protocolo de criopreservação para folículos ovarianos de zebrafish em estágio III utilizando a técnica de vitrificação. Uma série de crio-soluções foram formuladas e testadas quanto à sua capacidade de vitrificação empregando diferentes dispositivos de vitrificação. A toxicidade das soluções de vitrificação foi avaliada por meio da integridade de membrana dos folículos ovarianos utilizando coloração com trypan blue. Além disso, foi investigado o efeito do protocolo de vitrificação sobre os folículos em nível sub-celular, através da medição da concentração de ATP citoplasmático e da distribuição e atividade mitocondrial, utilizando a sonda fluorescente JC-1 e microscopia confocal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A vida em baixas temperaturas

Ao redor do mundo a natureza exhibe características que chamam nossa atenção. Observamos ambientes em que não existe água no estado líquido ao longo do inverno, e mesmo assim, quando chega a primavera, a vida floresce, sem qualquer repovoamento de climas mais quentes. O que é este estado que alguns seres vivos habitam - que aos nossos olhos o tempo parece não passar - mas estes organismos continuam vivos? Este fenômeno curioso é a essência da criobiologia.

Para muitos animais que vivem em climas com temperaturas extremas durante o inverno, a capacidade de sobreviver ao congelamento dos fluidos corporais é uma habilidade necessária à sua existência. Várias estratégias têm sido elaboradas por diferentes animais para suportar os rigores associados à formação do gelo em baixas temperaturas.

Existem alguns vertebrados inferiores que hibernam em zonas de temperatura onde o crescimento de gelo no fluido extracelular é tolerado dentro de certos limites. Por exemplo, a rã madeira (*Rana sylvatica*) é capaz de resistir a temperaturas tão baixas quanto $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$, com 65% da água do seu corpo convertida em gelo, ou em temperaturas ao redor de $-2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por períodos de até duas semanas. A formação de gelo dessa magnitude provoca a cessação de todos os movimentos musculares (cardíaco, respiratório, vasoconstritor, esquelético), o início da isquemia, e grandes mudanças no volume das células e órgãos (Muldrew & McGann, 1999).

Outras espécies de rãs e algumas tartarugas apresentam semelhante tolerância ao congelamento, e há também muitos outros répteis e anfíbios que são capazes de suportar curtas e leves exposições ao congelamento, típicos de regiões com queda brusca de temperatura durante a noite. Vários fatores influenciam a capacidade de um vertebrado em sobreviver a formação de gelo extracelular, no entanto, não existem exemplos de vertebrados capazes de suportar a formação do gelo intracelular.

Torna-se muito interessante observar a estratégia que os peixes polares desenvolveram ao longo de sua evolução para lidar com o ambiente marinho congelante. A água do mar congela a $-1,9\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura que é facilmente atingida durante o inverno em regiões oceânicas polares. Isto é bem abaixo do ponto de fusão dos fluidos corporais de peixes marinhos ($\cong -1,2\text{ }^{\circ}\text{C}$) (DeVries & Wohlschlag, 1969). Além da baixa temperatura, o ambiente marinho apresenta pequenos cristais de gelo em suspensão por toda a água quando

atinge o ponto de congelamento. Uma vez vivendo neste ambiente, e a passagem da água (com cristais de gelo) através das brânquias sendo necessária, seria impossível para esses peixes evitar o crescimento de gelo dentro de seus corpos. Estes peixes “super-resfriados” apresentam concentrações plasmáticas de proteína muito maior do que outros animais polares (Hargens, 1972), e a resistência ao congelamento é conferida pela expressão de altas concentrações de glicoproteínas anticongelantes (DeVries, 1988) e uma proteína anticongelante potencializadora (Jin, 2003) em seus fluidos extracelulares. Estas proteínas anticongelantes inibem a formação de cristais de gelo no organismo, em conjunto com outros íons e osmólitos, diminuindo o ponto de congelamento do sangue e do fluido intestinal para até 1°C abaixo da temperatura ambiente mais fria, impedindo o congelamento e morte desses animais (Raymond & DeVries, 1977; DeVries & Cheng, 1992).

2.2. Princípios de criobiologia

A história da criobiologia remonta à antiguidade, cerca de 2.500 a.C. no Egito, onde o frio já era usado para estancar hemorragias e inchaços (Muldrew & McGann, 1999).

Criobiologia (do grego *kryos* = frio, *bios* = vida, e *logos* = ciência) é um campo da biologia que estuda a vida em baixas temperaturas e o impacto das baixas temperaturas sobre materiais biológicos. A criobiologia lida com qualquer temperatura abaixo da variação fisiológica normal e inclui áreas como hipotermia, hibernação, estocagem de órgãos em gelo (medicina), etc. No entanto, na maioria dos casos a criobiologia esta associada com temperaturas abaixo de zero e os efeitos do congelamento e descongelamento sobre os materiais biológicos.

A criopreservação é o processo de estocar e manter sistemas vivos (células e alguns tecidos simples) em um estado viável em baixas temperaturas. Geralmente, os materiais biológicos são estocados em gelo seco (-80 °C), suspensos em vapor de nitrogênio líquido (abaixo de -130 °C) ou imersos em nitrogênio líquido (-196 °C), sendo a estocagem em nitrogênio líquido o método mais amplamente utilizado. Em temperaturas tão baixas (criogênicas) os níveis de energia cinética são demasiadamente baixos para permitir o movimento molecular (Grout et al., 1990), e qualquer atividade biológica, incluindo reações bioquímicas que levariam ao envelhecimento e morte celular são efetivamente paralisadas (Mazur et al., 1984). Entretanto, o próprio processo de criopreservação é associado com dano e até mesmo morte celular, os quais podem ocorrer durante o congelamento ou descongelamento e retorno à temperatura fisiológica original.

2.2.1. Dano celular em temperaturas hipotérmicas: injúrias pelo resfriamento e choque frio

Em criobiologia, temperaturas sub-fisiológicas acima do ponto de congelamento são chamadas de temperaturas hipotérmicas. As injúrias causadas às células em condições hipotérmicas podem ser divididas em dois tipos principais: injúrias causadas pelo frio durante o processo de resfriamento lento e injúrias causadas por altas taxas de resfriamento (choque frio) (Belous & Grischenko, 1994).

Um dos principais danos causados pelo resfriamento é o distúrbio do equilíbrio homeostático, resultante dos diferentes efeitos do frio sobre os processos enzimáticos e não enzimáticos no interior da célula. Essas injúrias estão associadas com estresse oxidativo e peroxidação de lipídios, o que pode levar a apoptose. O choque frio (choque de temperatura) é dependente e ocorre principalmente em altas taxas de resfriamento, podendo acarretar dano e morte celular. Geralmente a incubação em soluções hipertônicas antes do resfriamento amplifica o choque térmico (Gordienko & Pushar, 1994). Como resultado do choque frio, as células perdem K^+ intracelular e tornam-se permeáveis a substâncias nas quais são geralmente impermeáveis (ex. sacarose). Estudos em animais e plantas mostram que as mitocôndrias das células tornam-se superpermeáveis e inchadas após amostras de tecidos serem submetidas a baixas temperaturas (+4 °C) por resfriamento rápido (Rauen et al., 1999).

A fluidez da membrana é dependente do nível de colesterol, da composição de fosfolipídios, do grau de insaturação e da concentração de proteínas, podendo essa composição ser utilizada como um indicador de alterações na fluidez (Giraud et al., 2000). Durante o resfriamento, as transições na fase lípida resultam na desorganização e extravazamento da membrana, afetando a viabilidade celular. Outro dano causado pelo resfriamento é a desnaturação de proteínas, devido a variação de temperatura (Lattman et al., 1994). Como a estrutura das moléculas de água e das pontes de hidrogênio tornam-se mais ordenadas pela exposição à baixa temperatura, acredita-se que as ligações hidrofóbicas entre as cadeias proteicas laterais são afrouxadas e, conseqüentemente, a conformação das moléculas da proteína mudam resultando em desnaturação (Tajima & Shimizu, 1973). O resfriamento pode também induzir ao estresse oxidativo, levando a produção de espécies reativas de oxigênio (McKersie et al., 1990; Tsang et al., 1991; Scandalios, 1993), o que pode causar a desnaturação de proteínas, peroxidação de lipídios e apoptose celular (Wood & Youle, 1995; Prasad, 1996).

2.2.2. Injúrias causadas pelo congelamento

As injúrias por congelamento, como o próprio nome já sugere, ocorrem em temperaturas abaixo do ponto de congelamento. Este tipo de injúria está intimamente relacionada com a formação de cristais de gelo intra e extracelular.

Quando a temperatura de um sistema biológico diminui, uma série de processos ocorre. A queda na temperatura desacelera o movimento Browniano das moléculas. Quando a temperatura atinge o ponto de congelamento, a nucleação pode acontecer (Figura 1).

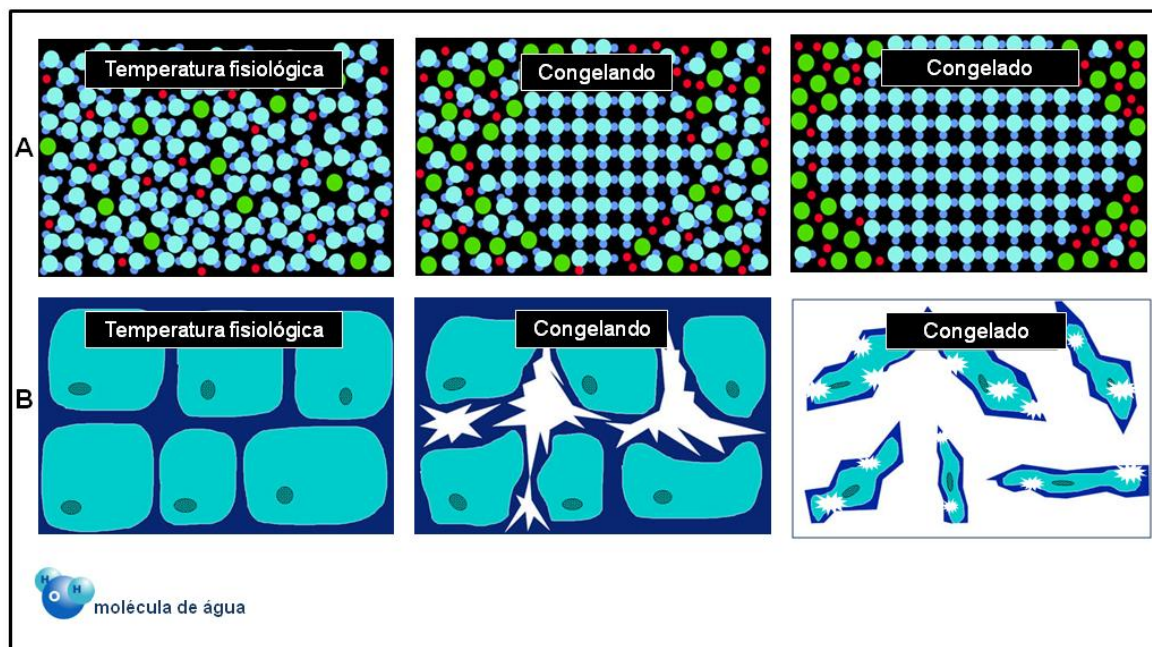


Figura 1. Processo de cristalização de uma solução evidenciando as etapas de nucleação e crescimento de cristais de gelo em escala molecular (linha A) e celular (linha B). A nucleação é a etapa em que as moléculas de água começam a se juntar em clusters de forma ordenada. Esses clusters constituem o núcleo e só se tornam estáveis a partir de certo tamanho crítico. O crescimento do cristal é o subsequente crescimento do núcleo que atingiu o tamanho crítico do cluster (alcançou a estabilidade termodinâmica). O congelamento inicia-se com a formação de gelo no meio extracelular, e o crescimento contínuo e desordenado dos cristais acarreta a lesão e destruição das células.

Em alguns casos a nucleação e o crescimento de cristais de gelo ocorrem imediatamente ao atingir o ponto de congelamento, no entanto, o super-resfriamento acontece com mais frequência. É chamado super-resfriado o estado metaestável em que uma suspensão celular ou líquido resfriado lentamente atinge temperaturas abaixo do seu ponto de cristalização, no entanto, mantendo-se no estado líquido. O estado super-resfriado normalmente é atingido utilizando uma solução com alta viscosidade (o que dificulta a formação e expansão dos cristais de gelo) ou pela ausência de centros de cristalização na solução. O estado super-resfriado não é estável e qualquer perturbação nas condições físicas pode levar a nucleação e cristalização da solução. Na maioria dos casos a formação do gelo se inicia no meio extracelular, porém o surgimento intracelular de cristais de gelo é uma questão de tempo. Na prática, a formação intracelular de gelo pode ocorrer através de dois mecanismos principais: nucleação homogênea devido ao super-

resfriamento crítico do citoplasma (nucleação catalisada por volume), ou mais possivelmente, através da nucleação heterogênea por cristais de gelo extracelular, os quais entram em contato com o citoplasma via membrana plasmática danificada (nucleação catalisada por superfície).

A presença de gelo extracelular afeta a composição da fração líquida remanescente extracelularmente, levando a um aumento da concentração do soluto. Isso resulta em um desequilíbrio entre o meio intracelular e a solução extracelular ainda não congelada. O aumento da pressão osmótica no espaço extracelular cria um gradiente osmótico através da membrana plasmática, o que resulta em água fluindo para fora da célula e congelando externamente (Mazur, 1963; Mazur et al., 1984). Se a taxa de resfriamento é moderada, as células perdem água através da membrana plasmática semipermeável em uma velocidade suficiente para concentrar o soluto intracelular, eliminando o super-resfriamento e mantendo o equilíbrio do potencial químico entre a água intra e extracelular. Como resultado, a célula desidrata e não congela. Se o resfriamento é muito rápido, a taxa na qual o potencial químico na solução extracelular diminui é mais rápida que a taxa na qual a água pode difundir para fora da célula, e resulta em formação de gelo intracelular, que é letal (Mazur, 2004). Por outro lado, se a taxa de resfriamento é muito lenta, as células serão expostas a uma condição hipertônica na fração líquida residual por um período de tempo suficientemente longo para sofrerem injúrias, antes de atingirem a temperatura ultra-baixa utilizada para o armazenamento. Esse fenômeno é conhecido como efeitos da solução (Mazur, 1970).

2.3. Os crioprotetores

Crioprotetores são agentes químicos que podem ser utilizados para reduzir as injúrias causadas à célula durante o congelamento e descongelamento. Existem cerca de 100 substâncias que têm sido testadas como agentes crioprotetores (CPAs). Substâncias das mais diversas classes químicas podem apresentar propriedades crioprotetoras, entre elas estão: os alcoóis (metanol, etileno glicol, propileno glicol, glicerol, etc.), óxidos (dimetil sulfóxido, piridina-óxido), aminoácidos (alanina, valina, prolina, serina), carboidratos (glicose e vários mono e dissacarídeos) e proteínas (albumina, gelatina). Cada um desses grupos de químicos tem diferentes mecanismos de ação crioprotetora.

2.3.1. História

Pesquisadores vêm estudando os limites da vida em baixas temperaturas desde o século XV, quando Henry Power relatou a sobrevivência de enguias após serem submetidas em seu laboratório, a um banho congelante contendo água, gelo e sal (Sittig, 1963). No século XVIII os cientistas franceses Bufon & Gamaile foram os primeiros a relatar que a razão pela qual as células morriam era a formação de cristais de gelo internamente, resultando na ruptura

das células (Belous & Grischenko, 1994). As principais contribuições para os conhecimentos iniciais sobre biologia em baixas temperaturas foram dadas por Spallanzani no final do século XVIII, com tentativas de reviver peixes, anfíbios e invertebrados congelados ou desidratados (Sittig, 1963). Em 1893 o físico suíço Pictet afirmou a recíproca dependência da crio-estabilidade dos organismos vivos com a complexidade da sua organização. Ele também concluiu que todas as reações químicas cessam completamente em temperaturas abaixo de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Isso está em conformidade com o moderno conceito de temperatura eutética, abaixo da qual os componentes celulares estariam no estado sólido e, portanto qualquer conversão química é praticamente impossível (Belous & Grischenko, 1994). No início do século XX Maximov destacou que o protoplasma de células de organismos congelados sofre uma pressão dos cristais de gelo que crescem no espaço intercelular. Isso, por sua vez, resulta em compressão e coagulação das partículas coloidais do protoplasma. Na visão de Maximov a mortalidade das células congeladas é determinada principalmente não pela temperatura de congelamento, mas pela quantidade de gelo que é formado dentro do tecido e pelo grau de desidratação do mesmo. Luyet & Gehenio (1940) investigaram a microestrutura dos cristais de gelo em detalhes, e avaliaram a influência da taxa de congelamento e diversos solutos (sais, proteínas, açúcares, etc.) no tamanho e forma dos cristais.

Sem sombra de dúvidas, o fato que mudaria para sempre a história da criobiologia ocorreu em 1949 na Inglaterra. Chris Polge, Audrey Smith e Alan Parkes estavam tentando criopreservar espermatozóides de galo. O meio usado na época para a manipulação de células espermáticas era uma solução salina suplementada com leite em pó desnatado, gema de ovo, açúcares e outros compostos. Os pesquisadores foram modificando a composição desta solução de criopreservação, e avaliavam a motilidade dos espermatozóides após o congelamento. Os resultados nunca apresentavam motilidade superior a 5%. Eles utilizavam glicerol para imobilizar o espermatozóide para o exame microscópico. Era mais um dia de rotina na série de experimentos, quando os pesquisadores foram surpreendidos por uma alta motilidade após o congelamento ($> 50\%$). Eles repetiram o experimento diversas vezes, alcançando o mesmo resultado notável. Convencidos de que tinham resolvido o problema, eles saíram para comemorar. No dia seguinte, ao demonstrarem para seus colegas, a motilidade pós-descongelamento novamente não passava de 5%. A única diferença era que eles haviam misturado um novo lote da solução de criopreservação. Recuperando a garrafa vazia do dia anterior, e extraindo as últimas gotas da solução restante, análises químicas revelaram que a solução continha uma elevada concentração de glicerol. Ao retratar os acontecimentos, descobriram que havia ocorrido a queda de várias garrafas na geladeira, e alguém havia substituído os rótulos das garrafas de forma errada, então o que eles pensavam ser a solução de criopreservação, era na verdade a solução de glicerol que até então era utilizada para imobilizar os espermatozóides para avaliação morfológica.

Após essa descoberta, uma série de avanços pela equipe de Polge resultou em 1950 nos primeiros pintos oriundos de ovos fertilizados com sêmen

congelado (Polge et al., 1949). Em 1951, o nascimento do primeiro bezerro fruto de uma inseminação artificial, utilizando sêmen que havia sido congelado por período superior a um ano (Stewart, 1951). Em 1973, ocorreu o nascimento do primeiro bezerro a partir de um embrião criopreservado (Wilmot & Rowson, 1973). Estes avanços tiveram profundas consequências no desenvolvimento da inseminação artificial e melhoramento genético em gado. Naquela época, não estava previsto que o congelamento de embriões teria também uma grande utilização na reprodução humana assistida, como acontece atualmente (Bos-Mikich et al., 2011).

2.3.2. Crioprotetores permeáveis e não permeáveis

Desde a descoberta da ação crioprotetora do glicerol por Polge (1949) uma grande variedade de compostos foram investigados. Essas substâncias adicionadas para exercer função crioprotetora sobre a célula precisam ser hidrossolúveis e ter baixa citotoxicidade. Os CPAs são divididos em duas categorias: os permeáveis (intracelular) e os não-permeáveis (extracelular). Estes dois grupos de CPAs comportam-se de maneiras diferentes durante o congelamento e descongelamento.

Os CPAs permeáveis tais como metanol, dimetil sulfoxido (DMSO), etileno glicol e propileno glicol são substâncias de baixo peso molecular capazes de penetrar nas células e conduzir sua ação protetora por todo o citoplasma e organelas (Figura 2). Essas substâncias diminuem a temperatura de congelamento intracelular, atuando como supressores da formação de cristais de gelo (Mazur et al., 1984; Woods et al., 1999), além de promoverem um tamponamento osmótico para as células durante o congelamento/descongelamento atuando como solventes secundários de sais (Pegg, 1984). Os CPAs não-permeáveis são aquelas substâncias que possuem alto peso molecular e portanto não conseguem penetrar no interior das células, mas promovem sua ação protetora externamente. Açúcares, especialmente os dissacarídeos, são geralmente adicionados ao meio crioprotetor juntamente com CPAs permeáveis, e promovem sua ação protetora através da desidratação das células, diminuindo os riscos de formação de gelo intracelular. Os açúcares como sacarose, trealose, lactose, maltose, xilose, manose e ribose são comumente utilizados, bem como polióis de estrutura similar como o sorbitol, ribitol, inositol, manitol e eritrol.

Outra classe de CPAs não-permeáveis são as diversas substâncias poliméricas. Polímeros como poli-etilenoglicóis e poli-propilenoglicóis de diferentes pesos moleculares, polivinilpirrolidona (PVP), uma variedade de ficóis e dextranos são também utilizados. O mecanismo de ação desses compostos poliméricos está principalmente relacionado ao seu efeito protetor de membrana. As moléculas desses polímeros formam uma espécie de revestimento na membrana plasmática, aumentando sua estabilidade. Em alguns casos um “efeito de fortificação” acontece, ou seja, a incrustação de moléculas poliméricas na membrana plasmática e conseqüentemente seu reforço (Belous & Grischenko, 1994). Além disso, polímeros como PVP agem como tampões salinos, diminuindo a concentração efetiva de sais, aliviando os

efeitos da solução e reduzindo a proporção de água livre na solução extracelular (Ashwood-Smith, 1987).

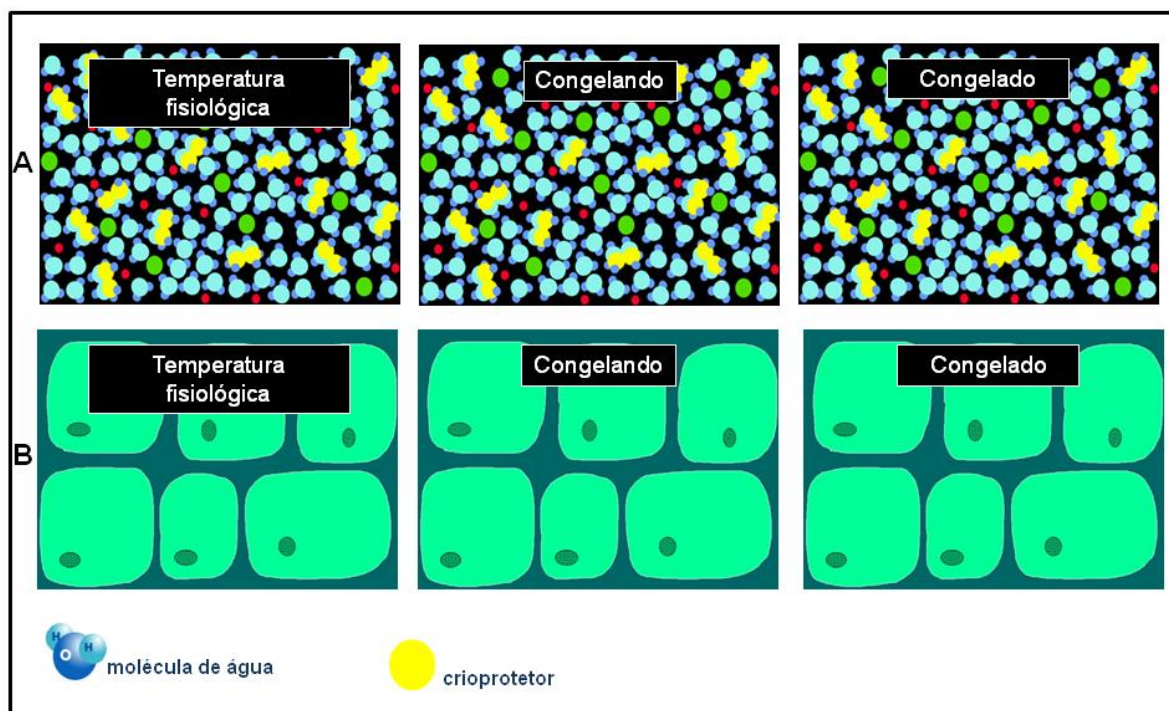


Figura 2. Mecanismo de ação dos crioprotetores em escala molecular (linha A) e celular (linha B). Os crioprotetores além de atuarem diminuindo o ponto de congelamento intracelular, interagem com as moléculas de água de forma a impedir sua organização em clusters ordenados, evitando a formação de núcleos de cristalização.

Recentemente, as glicoproteínas anticongelantes obtidas a partir do soro de espécies de peixes polares tem sido testadas como CPAs não-permeáveis e supressores da formação de cristais de gelo em diversos tipos celulares (Weng et al., 2000; Robles et al., 2006). A gema de ovo de galinha é outro componente geralmente adicionado aos meios crioprotetores, sendo bem conhecida por suas propriedades de reduzir a toxicidade dos CPAs químicos e proteger a integridade das membranas, aumentando assim a chance de sobrevivência das células (Isachenko & Nayudu, 1999).

2.3.3. Mecanismos de toxicidade dos crioprotetores

Apesar de os CPAs serem essenciais para o sucesso na criopreservação de materiais biológicos, todos são de alguma forma prejudicial às células, especialmente quando utilizados em altas concentrações. Cada crioprotetor tem seu próprio mecanismo de toxicidade, no entanto, todos possuem efeitos similares sobre as células. A adição e remoção dos CPAs causa um estresse osmótico inevitável ao material biológico e membranas celulares (Armitage, 1987; Gordienko & Pushkar, 1994). Em altas concentrações os CPAs causam desnaturação de proteínas, através da distorção das suas estruturas secundárias e terciárias e, portanto, prejudicando a função de enzimas, proteínas estruturais e canais de protoplasma. Os CPAs em alta concentração podem também levar a um desarranjo da bicamada lipídica e deterioração de toda a estrutura celular. Existe uma teoria genérica para a toxicidade dos CPAs, a qual indica que seus efeitos prejudiciais em temperatura ambiente são resultantes das mesmas propriedades as quais promovem seu efeito estabilizador em temperaturas abaixo de zero. Em baixas temperaturas, as moléculas dos CPAs são termodinamicamente excluídas da capa de solvatação das proteínas, portanto estabilizando-as, ao passo que em temperatura ambiente as proteínas são desestabilizadas devido a interação hidrofóbica entre a proteína e as moléculas do crioprotetor tornar-se robusta (Arakava et al., 1990).

2.4. Técnicas de criopreservação

Durante as últimas décadas, duas técnicas têm sido utilizadas na criopreservação de materiais biológicos: o congelamento lento controlado e a vitrificação.

2.4.1. Congelamento lento controlado

A primeira a ser desenvolvida foi a técnica de congelamento lento controlado (Whittingham, 1971; Whittingham et al., 1972; Wilmut, 1972; Willadsen et al., 1976, 1978).

A técnica de congelamento lento controlado de amostras biológicas a uma específica temperatura e taxa de resfriamento pré-estabelecida se tornou possível a partir da disponibilidade de congeladores programáveis, capazes de ser controlados por um computador. Tais equipamentos permitem o resfriamento da amostra de acordo com um programa rigorosamente definido, bombeando vapor de nitrogênio líquido (NL) ao longo de uma câmara onde a amostra é depositada. No congelamento lento controlado, os parâmetros cruciais que determinam o sucesso da criopreservação são: a taxa de resfriamento, a temperatura do *seeding*, a temperatura em que as amostras são mergulhadas em NL, a taxa de descongelamento e a remoção dos crioprotetores.

2.4.1.1. Taxa de resfriamento

A ótima taxa de resfriamento para atingir um congelamento equilibrado para um dado tipo celular é aquela onde essa taxa é lenta o bastante para permitir o grau de desidratação celular necessário durante o congelamento (o qual previne a formação de cristais de gelo intracelular), e rápida o suficiente para evitar a superexposição das células aos efeitos tóxicos dos CPAs e soluções salinas concentradas (Muldrew & McGann, 1997). Essa ótima taxa de resfriamento é específica para cada tipo de célula e é determinada por parâmetros como o tamanho das células, relação superfície/volume, permeabilidade da membrana plasmática à água e crioprotetores, grau de hidratação da célula e dependência da permeabilidade de membrana em relação a temperatura.

A tendência geral em criobiologia prática é: quanto maior o tamanho da célula, menor é sua relação superfície/volume; quanto menor sua permeabilidade de membrana, mais lenta deve ser a taxa de resfriamento utilizada na sua criopreservação. O aumento da concentração de CPAs na amostra geralmente reduz o valor de ótima taxa de resfriamento (Mazur et al., 1970; Gordienko & Pushkar, 1994).

2.4.1.2. *Seeding*

Durante o congelamento, a solução irá super-resfriar abaixo do seu ponto de congelamento até ocorrer a nucleação espontânea e a formação de cristais de gelo. Durante esse processo, a formação de gelo intracelular ocorrerá aleatória e imprevisivelmente, e a quantidade de gelo intracelular aumentará drasticamente quando a solução atingir elevado grau de super-resfriamento, o que poderá causar severos danos às células, e as taxas de sobrevivência terão uma enorme variação (Toner et al., 1993).

O *seeding* é o procedimento frequentemente usado para induzir intencionalmente o crescimento controlado de gelo no meio extracelular, e conseqüentemente, um considerável aumento da concentração de íons, macromoléculas e outros componentes incluindo os CPAs ocorre no fluido remanescente (Mazur, 1990; Vajta & Nagy, 2006). O *seeding* normalmente é realizado tocando o recipiente que contém a amostra com um instrumento metálico (ex. pinça) previamente mergulhado em NL. O ritmo lento do processo permite a troca de solução entre os fluidos intra e extracelular sem sérios efeitos osmóticos e deformações às células. Apesar de a concentração desses componentes, especialmente os CPAs, parecer altamente perigosa ao final do processo, isso acontece em baixas temperaturas, onde o real efeito tóxico é mínimo. Por outro lado, essa elevada concentração minimiza a formação de cristais de gelo, permitindo a solidificação da água intracelular sob a forma semelhante a vidro (vítrea).

Diferentes temperaturas de *seeding* têm sido utilizadas. É comum o uso do *seeding* a -7 °C para concentração de CPAs ao redor de 1,5 M (Lassale et al., 1985; Carroll et al., 1993; Stachecki et al., 1998; Salle et al., 1999; Stachecki & Willadsen, 2000; Yi et al., 2001; Picton et al., 2002), apesar de

temperaturas como -5 °C (Critser et al., 1988), -8 °C (Candy et al., 2000) e -9 °C (Newton et al., 1996) também serem utilizadas. Para concentração de CPAs de 2 M o *seeding* à -7,5 °C é comum, entretanto temperaturas como -6 °C (Bass et al., 2004) e até mesmo -5,5 °C (Zhang et al., 1989) já foram utilizadas.

2.4.1.3. Temperatura de mergulho em NL

Temperatura de mergulho é aquela na qual o resfriamento das amostras em um congelador programado se conclui, e as amostras são então mergulhadas em NL para estocagem a longo prazo. Quando as amostras estão sendo mergulhadas em NL, sua temperatura decai rapidamente (200-300 °C/min) até estabilizar e entrar em equilíbrio com a temperatura do NL (-196 °C). As temperaturas de mergulho usadas nas práticas de criopreservação estão normalmente abaixo da temperatura eutética do complexo água-sal-crioprotetor (-20 a -40 °C). Isso significa que na temperatura de mergulho quase toda a água dentro e fora das células está na fase sólida, excluindo uma pequena fração de água ligada à membrana, a qual congela aproximadamente a -150 °C (Belous & Grischenko, 1994). Após as amostras atingirem o equilíbrio com a temperatura do NL, todos os processos físicos e bioquímicos no material biológico – reações metabólicas, processos de difusão, dissipação de energia, movimentos de membrana e deslocação de proteínas e ácidos nucleicos, etc. – são completamente paralisados, e as amostras podem ser estocadas em tal estado por anos ou mesmo décadas praticamente sem qualquer perda adicional na viabilidade.

2.4.1.4. Descongelamento

O descongelamento é uma etapa muito importante em um protocolo de criopreservação, haja vista os muitos processos que podem acontecer, afetando negativamente a viabilidade das células preservadas.

O descongelamento lento é geralmente realizado em um congelador programável ou com menos frequência, apenas expondo a amostra ao ar em temperatura ambiente. O descongelamento rápido é conduzido através da imersão da amostra em banho-maria com temperatura controlada (geralmente 20-38 °C). Alguns profissionais também usam campos com frequência eletromagnética (fornos micro-ondas especiais) para descongelar as amostras, no entanto, esse descongelamento por micro-ondas foi por vezes considerado inadequado, uma vez que gera diferenças dramáticas de temperatura ao longo da amostra, formando “ilhotas” de alta temperatura que podem danificar as células (Robinson et al., 2002). Esse descongelamento em água ou ar também apresenta certas limitações, incluindo aquecimento desigual da amostra e a falta de controle sobre o processo.

A maioria dos criobiologistas considera o descongelamento rápido como mais vantajoso, uma vez que ele diminui o risco de recristalização e formação de grandes cristais de gelo dentro da amostra. O descongelamento rápido também encurta o tempo de exposição das células às soluções crioprotetoras acima da temperatura eutética (Gordienko & Pushkar, 1994).

Entretanto, existe uma opinião de que com a aplicação de taxas lentas de congelamento o efeito da taxa de descongelamento sobre a viabilidade das amostras não é importante. O estudo de Abbeel et al. (1994) mostrou que a escolha da taxa de descongelamento deve ser determinada pela temperatura na qual as amostras foram mergulhadas em NL e também pela natureza dos CPAs utilizados.

2.4.1.5. Remoção dos crioprotetores

Após as amostras serem descongeladas e atingirem a temperatura (fisiológica) normal, é necessário remover os CPAs. Isso normalmente implica em lavar as células em meios de cultura específicos livres de CPAs. Durante esse procedimento, estresse osmótico é induzido nas células devido ao drástico transiente de pressão osmótica através da membrana plasmática. A fim de amenizar esse efeito não desejado, a diluição gradual dos crioprotetores é frequentemente utilizada (Wessel & Ball, 2004).

Após a remoção dos CPAs as células são geralmente incubadas em meios especialmente formulados, suplementados com elevadas concentrações de substâncias nutritivas e estabilizadores de membrana, como açúcares, a fim de potencializar sua recuperação frente aos danos associados ao processo de congelamento/descongelamento ao qual foram submetidas (Belous & Grischenko, 1994). Na sequência, as células podem ser utilizadas para fins clínicos, práticas ou de pesquisa.

2.4.2. Vitrificação

A vitrificação como técnica de criopreservação foi introduzida por Rall & Fahy (1985) como a primeira criopreservação “livre de gelo”, utilizando um embrião de camundongo. A vitrificação se caracteriza pela solidificação de um líquido provocada não pela cristalização, mas por uma elevação extrema da sua viscosidade usando altas concentrações de CPAs e taxa de resfriamento ultra-rápida (Rall & Fahy, 1985).

Na verdade, o primitivo conceito de vitrificação foi apresentado com base nas observações de que o resfriamento de pequenos sistemas vivos em velocidades muito rápidas poderia eliminar a formação de gelo e atingir um estado vítreo (Luyet, 1937). No entanto, as rápidas taxas de resfriamento demandadas, que Luyet mencionou, não poderiam ser obtidas naquela época. A água não apresenta muita viscosidade, portanto sua vitrificação dentro das células pode ser atingida somente quando uma taxa extremamente rápida de resfriamento é alcançada, juntamente com uma elevada concentração de CPAs difusos dentro das células, os quais podem aumentar a viscosidade e reduzir a temperatura de congelamento no seu interior. Dessa forma, quando a solução é rapidamente resfriada e atinge o estado vítreo, toda a solução fica livre de cristais de gelo (Fahy, 1986). Existem algumas variáveis no procedimento de vitrificação que podem afetar sua eficiência, as quais serão detalhadas na sequência.

2.4.2.1. Taxa de resfriamento e aquecimento

Uma vitrificação bem sucedida exige rápidas taxas de resfriamento e aquecimento. A criopreservação por congelamento lento controlado é um processo onde a água extracelular cristaliza, resultando em um gradiente osmótico que drena a água do compartimento intracelular até a vitrificação intracelular ocorrer. Na criopreservação por vitrificação, ambos os compartimentos (intra e extracelular) vitrificam após a desidratação da célula. Devido a essas diferenças, os termos congelamento e descongelamento são relevantes para a técnica de congelamento lento controlado, ao passo que os termos resfriamento e aquecimento são relevantes para a técnica de vitrificação.

Quando uma amostra é imersa em NL, o mesmo sofre um leve aquecimento e ocorre um processo de ebulição. As amostras são revestidas por vapor, o qual cria uma camada isolante ao redor da amostra e diminui a taxa de resfriamento. Existem algumas maneiras de incrementar as taxas de resfriamento e aquecimento:

1) *Volume da solução*: a maneira mais eficiente de aumentar a taxa de resfriamento é utilizando o menor volume possível de solução crioprotetora circundante, a fim de estabelecer um contato direto entre a amostra e o NL (Arav, 1992; Arav et al., 2002; Yavin & Arav, 2007).

2) *Minimizar a formação de gás de revestimento*: a quantidade de gás formado ao redor da amostra pode ser reduzida colocando-as diretamente em uma placa metálica pré-resfriada (Huang et al., 2008; Zhang et al., 2008).

3) *Evitar a formação de vapor de NL*: a formação de vapor de NL pode ser evitada pelo uso de NL “*slush*”. Com o auxílio de um equipamento a temperatura do NL é reduzida pra entre -205 e -210 °C aplicando uma pressão negativa. O NL *slush* é então formado, e a taxa de resfriamento é drasticamente aumentada. A taxa de resfriamento é especialmente aumentada no primeiro estágio de resfriamento (de 20 a -10 °C), quando ela chega a ser de duas a seis vezes mais elevada que a taxa do NL comum (-196 °C) com palhetas de 0,25 ml ou qualquer outro instrumento como *open-pulled straws* (OPS) ou grades de microscopia eletrônica (Arav & Zeron, 1997).

2.4.2.2. Concentração de crioprotetores

A viscosidade do meio crioprotetor em que as amostras são mantidas é diretamente proporcional à chance de atingir a vitrificação.

A combinação de diferentes CPAs (permeáveis e não-permeáveis) tem se mostrado como uma abordagem bem sucedida no aumento da viscosidade e temperatura de transição vítrea das soluções (Saragusty & Arav, 2011), características que aumentam a chance de vitrificação e ao mesmo tempo reduzem a toxicidade individual específica de cada crioprotetor.

2.4.2.3. Vantagens e desvantagens da vitrificação

A vitrificação como técnica de criopreservação oferece diversos benefícios:

1) Diminui o tempo de procedimento, que é muito mais simples e rápido;

2) Uma criopreservação totalmente livre de gelo é sua principal característica, a qual elimina as injúrias letais causadas pela formação de cristais de gelo, que ocorrem durante os procedimentos de congelamento lento controlado;

3) Reduz as injúrias causadas pelo resfriamento por passar rapidamente pelas zonas de temperatura perigosa, o que é particularmente um benefício para espécies que apresentam alta sensibilidade ao frio, como oócitos de suínos e peixes;

4) Permite ao operador poder observar as amostras durante o processo;

5) Não exige equipamentos especializados ou caros, o que a torna uma técnica barata;

6) É uma boa alternativa para uso e condições de campo e em vários outros ambientes frequentemente encontrados quando se trabalha com espécies selvagens, zoológicos, locais pobremente equipados e remotos (Saragusty & Arav, 2011).

No entanto, muitas variáveis existem no processo de vitrificação, que se não bem administrados podem comprometer drasticamente sua eficiência. Entre elas está a alta concentração de crioprotetores necessária, a qual pode ser extremamente tóxica para as células; a temperatura da solução de vitrificação, que está diretamente associada com toxicidade e permeabilidade de membrana; o tempo de exposição à solução final de vitrificação antes de ser mergulhada no NL; os dispositivos utilizados e a habilidade e competência técnica do operador.

2.5. Criopreservação de gametas e embriões de espécies aquáticas

A criopreservação do germoplasma de espécies aquáticas traz a possibilidade de preservar determinadas espécies ou estirpes de interesse particular, aumentando a representação de animais geneticamente valiosos, estendendo a vida reprodutiva de um animal, e evitando perdas de material

genético através de doenças, catástrofes ou transferências entre locais (Zhang et al., 2007; Fornari et al., 2012). Na aquicultura, o sucesso na criopreservação de sêmen, oócitos e embriões ofereceria novas possibilidades comerciais, permitindo a produção de proles durante todo o ano, mesmo fora da estação reprodutiva das espécies. Outras vantagens incluem a melhor utilização das instalações de incubação e facilitar ações de transporte entre larviculturas. A criopreservação de germoplasma também fornece um seguro método *ex situ* para preservar o genoma de espécies ameaçadas de extinção (Cerdà et al., 2007).

A criopreservação de gametas de peixes tem sido intensivamente estudada nas últimas três décadas, e o sucesso no congelamento de espermatozoides de muitas espécies incluindo salmonídeos, ciprinídeos, ciclídeos, acipenserídeos, siluriformes, anastomídeos e caracídeos está bem documentada (Blaxter, 1953; Billard et al., 1995; Tsvetkova et al., 1996; Caffey & Tiersch, 2000; Tiersch, 2000; Carolsfeld et al., 2003; Linhart et al., 2005; Thirumala et al., 2006; Tiersch et al., 2007; Streit Jr et al., 2008a, 2008b; Martínez-Páramo et al., 2009; Viveiros & Godinho, 2009). Durante a última década, a criopreservação do sêmen tem se tornado uma das mais efetivas ferramentas para o gerenciamento da reprodução de peixes em cativeiro e conservação *ex situ* de espécies. Diversos criobancos de sêmen tem sido estabelecidos na Europa, América do Norte, América do Sul e Ásia, para a preservação e conservação do material genético de peixes.

A criopreservação de sêmen é uma biotécnica que reduz a quantidade de machos reprodutores a serem mantidos no plantel (Herman et al., 1994). O uso de sêmen congelado permite mover a informação genética do macho dentro e entre populações sem requerer sua presença física ou comportamento de acasalamento dos animais. Isso permite introduzir genes fundadores sem a necessidade de remover o indivíduo do seu ambiente, ou exigir o deslocamento dos animais entre pisciculturas/instituições. Além disso, resolve problemas de sincronismo entre machos e fêmeas, reduz custos de produção (Linhart et al., 2005), e o sêmen pode ser utilizado para preservar o potencial reprodutivo de um dado animal mesmo após sua morte.

Análises do impacto econômico da introdução do sêmen congelado no ciclo de produção de algumas espécies comerciais como o *catfish* (*Ictalurus punctatus*) e especialmente o salmão do Atlântico (*Salmo salar*) indicam o crescimento da indústria de sêmen, o que também é verdadeiro para outras espécies (Caffey & Tiersch, 2000). No Brasil, onde a aquicultura tem crescido nos últimos anos, é possível encontrar no Centro-Oeste do país (principalmente no estado do Mato Grosso) grandes pisciculturas, algumas com produção anual superior a 2,5 milhões de alevinos, com até 30% dessa produção sendo oriunda da utilização de sêmen congelado (Streit Jr, comunicação pessoal). Alguns estudos também têm sido conduzidos avaliando a criopreservação do sêmen de invertebrados aquáticos, incluindo espécies de equinodermos, moluscos, poliquetas e crustáceos (Gwo, 2000).

Apesar do sucesso na criopreservação de espermatozoides de mais de 200 espécies de peixes já ter sido alcançado (Billard & Zhang, 2001), todas as tentativas em criopreservar embriões de peixes falharam (Harvey, 1983;

Zhang et al., 1993; Zhang & Rawson, 1995, 1998; Hagedorn & Kleinhans, 2000; Cabrita et al., 2003; Robles et al., 2005; Valdez et al., 2005; Edashige et al., 2006). O sucesso reportado por Chen & Tian (2005) na vitrificação de embriões de linguado (*Paralichthys olivaceus*) foi contestado por Edashige et al. (2006), similar a situação com embriões de carpa comum (*Cyprinus carpio*) relatada por Zhang et al. (1989).

2.5.1. Obstáculos na criopreservação de embriões de peixes

Embriões de peixes, répteis, aves e anfíbios representam uma classe biológica multicompartimentalizada muito complexa (Ninhaus-Silveira et al., 2008). Rall (1993) apontou cinco características que prejudicam a criopreservação de embriões de teleósteos: um grande tamanho final; células de grande tamanho; a possibilidade de que cada compartimento do embrião apresente distintas propriedades osmóticas; a baixa permeabilidade das membranas que revestem o embrião e a alta sensibilidade a baixas temperaturas.

Em geral, os embriões de peixes são muito maiores do que a maioria dos embriões mamíferos. Em comparação com um zigoto humano, por exemplo, que tem cerca de 100 μm de diâmetro, o zigoto de peixes ($> 1 \text{ mm}$ de diâmetro) chega a ser mil vezes maior. Esse grande tamanho dos embriões de peixes resulta em uma baixa relação superfície/volume e menor permeabilidade de membrana para água e CPAs. Além disso, essa complexa estrutura de membranas dificulta ainda mais o transporte transmembrana (Janik et al., 2000; Kopeika et al., 2006). Muitas pesquisas já foram realizadas na tentativa de superar essas dificuldades relacionadas à criopreservação de embriões de peixes, incluindo a microinjeção de crioprotetores diretamente no citoplasma (Leung & Jamieson, 1991), uso de pressão negativa para aumentar a permeabilidade aos CPAs (Hagedorn et al., 1997), remoção do córion (Routray et al., 2002), microinjeção de proteínas anticongelantes (Robles et al., 2006), e até mesmo a aplicação de pressão hidrostática (Zhang & Rawson, 1995; Hagedorn et al., 1997; Dinnyes et al., 1998; Zhang et al., 2003; Valdez et al., 2005). Todas essas tentativas foram mal sucedidas.

A sensibilidade ao resfriamento dependente do estágio de desenvolvimento tem sido apontada como outro obstáculo importante (Zhang & Rawson, 1995; Ahammad et al., 1998; Lopes et al., 2012). A razão para essa sensibilidade ao frio dependente do estágio de desenvolvimento pode estar associada com as mudanças nas células e tipos de tecidos, número de células, eficiência dos mecanismos de reparo e reações enzimáticas. Apesar da presença dos CPAs reduzir um pouco das injúrias provocadas pela queda de temperatura, a prevenção dessas injúrias em temperaturas abaixo de zero é muito limitada em embriões de peixes (Liu et al., 1999, 2001).

A quantidade de vitelo é essencial para o desenvolvimento embrionário em peixes, sendo a fonte fornecedora de nutrientes, haja vista que para a grande maioria dos teleósteos a fecundação e o desenvolvimento embrionário se dão no meio aquático, fora do corpo materno (Vazzoler, 1996). No entanto, essa grande quantidade de vitelo torna-se uma barreira quase

intransponível, dificultando enormemente a desidratação celular e permeação dos CPAs, fazendo com que essa água aprisionada se transforme em cristais de gelo durante o congelamento.

2.5.2. A importância de um criobanco com genoma materno

A criopreservação de espermatozóides preserva somente o genoma paterno e isso não é suficiente para a preservação da diversidade genética, que depende também do genoma materno. A criopreservação do genoma materno é muito importante, visto que diversos fatores genéticos são herdados maternalmente pelo citoplasma do oócito, tal como DNA mitocondrial e mRNAs e que vão determinar os estádios iniciais de desenvolvimento embrionário (Zhang et al., 2007). A importância de ambos germoplasma, paterno e materno, tem sido a base para continuarmos as tentativas de desenvolver métodos para a criopreservação de embriões ou mesmo do gameta feminino em peixes.

2.5.3. Criopreservação de folículos ovarianos

Recentes estudos têm mostrado que a criopreservação de folículos ovarianos pode oferecer diversas vantagens quando comparada aos embriões de peixes, principalmente devido à ausência de um córion completamente formado. De acordo com Tsai et al. (2009b) folículos ovarianos em estágio inicial são menores em tamanho, resultando em uma maior relação superfície/volume e portanto podem ser mais permeáveis à água e solutos, melhorando as chances de sobrevivência durante a criopreservação. Embora diversos estudos tenham sido conduzidos na tentativa de criopreservar oócitos de peixes (Lubzens et al., 2003, 2004; Isayeva et al., 2004; Plachinta et al., 2004; Lubzens et al., 2005; Guan et al., 2008; Tsai et al., 2009a, 2009b), todos caem no uso de uma única técnica – o congelamento lento controlado – e o sucesso permanece ilusório assim como para os embriões.

2.6. Uso do zebrafish (*Danio rerio*) como espécie modelo

2.6.1. Informações gerais

O zebrafish (*Danio rerio*) é um teleósteo tropical de água doce, pertencente à família Cyprinidae. É originalmente encontrado em corpos d'água lênticos da região sudeste do Himalaia, incluindo Índia, Paquistão, Bangladesh, Nepal e Birmânia (Axelrod & Schultz, 1955). Quando adulta, a espécie raramente ultrapassa 4-5 cm de comprimento, possui um corpo cilíndrico com 7-9 listras azuis escuras sobre prata, que percorrem todo o corpo no sentido craniocaudal, e uma coloração verde oliva na região dorsal. Os machos são mais afilados (formato de torpedo) e geralmente dourados na região ventral, nadadeiras pélvica e peitoral. As fêmeas são geralmente mais prateadas e apresentam um abdômen muito maior, principalmente próximo à desova. A

maturidade sexual é atingida por volta de 10-12 semanas de vida, sendo sua reprodução tecnicamente aconselhada a partir dos seis meses, a fim de obter um bom desempenho reprodutivo e embriões de melhor qualidade (Suwa & Yamashita, 2007).

Entre os teleósteos, o zebrafish é um importante modelo experimental para estudos de biologia do desenvolvimento, fisiologia, genética e criobiologia (Buono & Linser, 1992; Leff, 1992; Zhang et al., 1993; Westerfield, 2000; Squire et al., 2008), sendo fácil de ser mantido e manipulado no laboratório. Seus oócitos são fertilizados externamente e sob simples condições laboratoriais podem produzir um grande número de ovos fertilizados diariamente. Seus embriões são grandes, de fácil obtenção, com desenvolvimento rápido e visível (Stainier & Fishman, 1992; Strehlow et al., 1994; Fishman et al., 1997; Westerfield, 2000).

2.6.2. Reprodução e estrutura ovariana

O zebrafish apresenta ovários do tipo cisto (cistovário). Assim como muitos outros teleósteos com desova parcelada, possui ovários sincrônicos em grupos, ou seja, folículos em diferentes estádios de desenvolvimento estão presentes ao mesmo tempo durante o período reprodutivo. Lotes de folículos de uma população de oócitos em vitelogênese tardia são periodicamente recrutados para a maturação. Uma fêmea adulta de zebrafish pode desovar diversas vezes dentro de um mês.

2.6.3. Desenvolvimento oocitário em zebrafish

O desenvolvimento oocitário em zebrafish é dividido em cinco estádios (Figura 3), baseado em critérios morfológicos, fisiológicos e eventos bioquímicos (Selman, 1993).

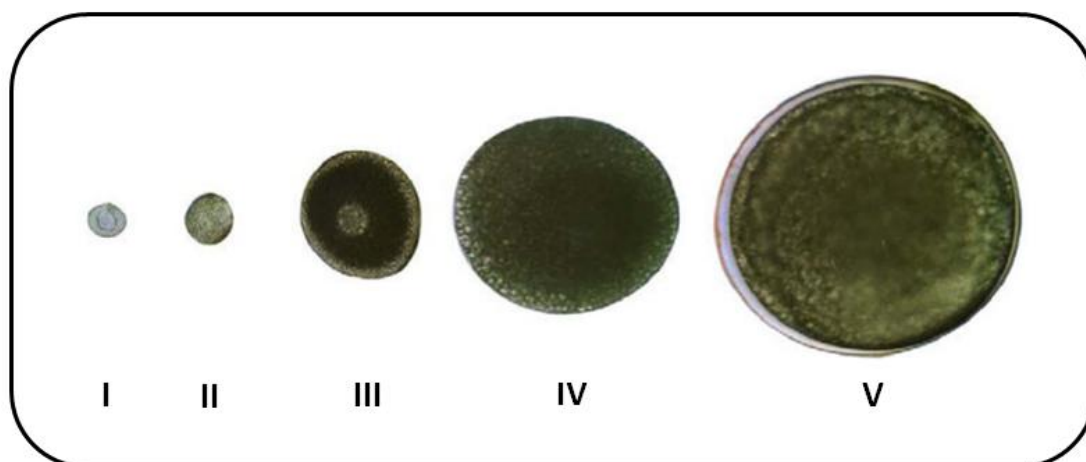


Figura 3. Estádios do desenvolvimento oocitário em zebrafish. (I) crescimento primário; (II) cortical-alveolar; (III) vitelogênese; (IV) maturação; e (V) maturo.

Estádio III: vitelogênese (estádio utilizado nos experimentos)

O termo vitelogênese geralmente descreve a incorporação da proteína vitelogenina pelo oócito e sua transformação em proteínas vitelínicas (Le Menn et al., 2007), mas precisa ser ampliado para incluir também a incorporação de outras moléculas, tais como lípidos e vitaminas (Lubzens et al., 2010).

A vitelogênese inicial é caracterizada por aumentos nos níveis do hormônio folículo estimulante (FSH) no plasma, e um incremento na expressão de receptores ovarianos para FSH. Estimuladas pelo FSH as células da teca fornecem substrato androgênico para as células da granulosa, que expressam P450 aromatase e produzem o 17β estradiol (E2). O E2 viaja pela corrente sanguínea e estimula o fígado a sintetizar vitelogenina. A vitelogenina é secretada na corrente sanguínea e absorvida pelo oócito via pinocitose, mediada por receptores específicos. Essa entrada de vitelogenina no oócito é cálcio-dependente e parece que os oócitos precisam atingir certo tamanho antes de serem capazes de sequestrar a vitelogenina. Após ser absorvida pelo oócito, a vitelogenina é acumulada na forma de plaquetas (corpos vitelínicos), onde é processada em proteínas vitelínicas menores (lipovitelina, fosvitina, componentes β) pela ação da enzima catepsina D (Hartling & Kunkel, 1999). A lipovitelina e a fosvitina são armazenadas em corpos vitelínicos e permanecem na forma cristalizada até serem utilizadas como nutriente. As enzimas da mesma família de catepsinas irão conduzir a completa proteólise dessas proteínas vitelínicas mais tarde, durante o consumo do vitelo pelo embrião em crescimento.

A vitelogênese é a fase mais longa do desenvolvimento do oócito e demanda uma enorme entrada de nutrientes. As vesículas vitelínicas aparecem primeiramente no citoplasma ao redor do núcleo e gradualmente aumentam em número e tamanho, enquanto se movem em direção a periferia. Além dos corpos vitelínicos, muitas gotículas de óleo também aparecem no ooplasma. A medida que a vitelogênese avança, a maior parte do ooplasma é ocupada pelos corpos vitelínicos. Durante a vitelogênese o oócito continua perdendo sua basofilia, o folículo (Figura 4) se torna mais opaco e a vesícula germinal é completamente invisível (Wallace & Selman, 1981; Riggio et al., 2003).

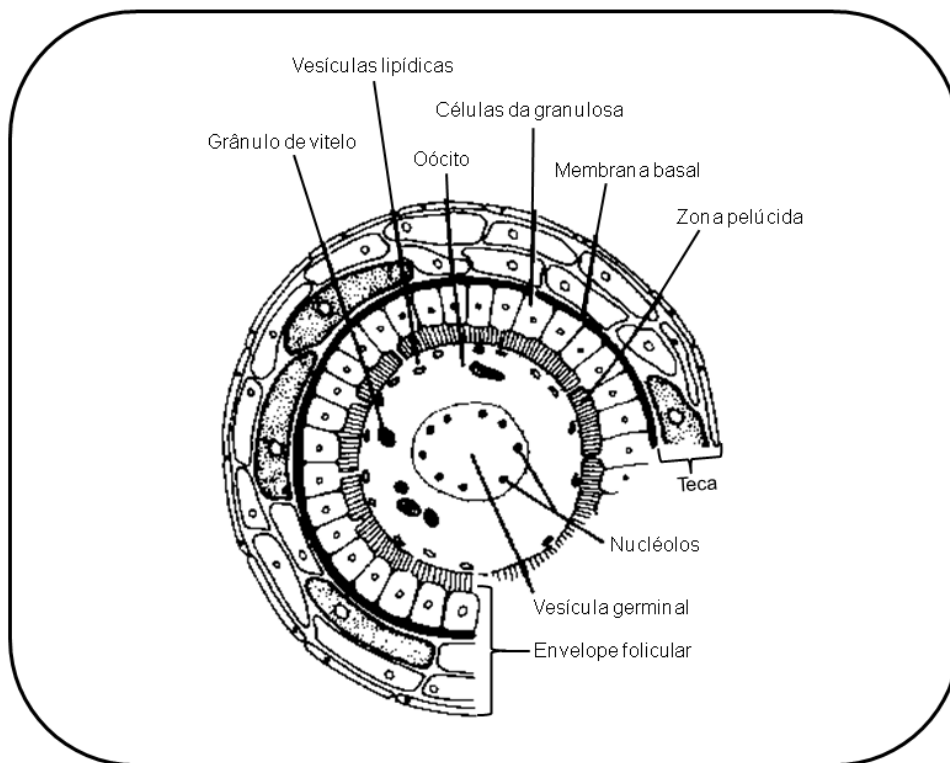


Figura 4. Representação do folículo ovariano durante a vitelogenese inicial em teleostes. (Adaptado de Nagahama et al., 1983).

3. OBJETIVOS, HIPÓTESES E ABORDAGEM PRETENDIDA

O principal objetivo deste projeto de Tese foi desenvolver um protocolo de criopreservação para folículos ovarianos de zebrafish (*Danio rerio*) em estágio III de desenvolvimento utilizando a técnica de vitrificação.

Apesar de alguns estudos já terem sido realizados na área de criopreservação de folículos ovarianos de zebrafish, todos caem no uso de uma única técnica – o congelamento lento controlado – e o sucesso permanece inatingível assim como acontece para embriões. A vitrificação de folículos ovarianos em peixes permanece como uma técnica inexplorada. Com base nessa constatação, somada a alguns pontos já levantados ao longo do capítulo de revisão, o projeto foi conduzido tendo as seguintes hipóteses:

Hipóteses:

1) A ausência de formação de cristais de gelo durante a vitrificação poderia eliminar um dos principais fatores que causam dano e morte celular, oferecendo vantagens que poderiam contribuir para superar algumas das dificuldades encontradas até agora, quando se utiliza a técnica de congelamento lento controlado;

2) Os folículos ovarianos oferecem diversas vantagens morfo-estruturais quando comparados aos embriões, o que poderia contribuir para o sucesso do protocolo de vitrificação. Além dessas vantagens, nós particularmente decidimos utilizar folículos em estágio III devido ao fato que: uma vez alcançado o sucesso no protocolo de vitrificação, os folículos nesse estágio podem ser submetidos à maturação *in vitro* e posterior fertilização, com base no protocolo desenvolvido pelo grupo de Seki et al. (2008);

3) A criopreservação de fragmentos ovarianos contendo os folículos *in situ* poderia ser mais efetiva que a criopreservação de folículos isolados, tornando-os melhor protegidos das crio-injúrias.

A fim de testar as hipóteses levantadas, o projeto foi dividido em cinco etapas de investigação:

1° - Capacidade vitrificante dos crioprotetores

A determinação da concentração mínima necessária para um crioprotetor alcançar o estado vítreo é o primeiro passo na formulação de soluções crioprotetoras a serem utilizadas em um protocolo de vitrificação. Para esta etapa da pesquisa, a capacidade vitrificante de cinco crioprotetores permeáveis (metanol, etanol, DMSO, propileno glicol e etileno glicol) foi testada para uma ampla gama de concentrações, utilizando três diferentes dispositivos de vitrificação (palheta plástica de 0.25 ml, bloco de vitrificação e Fibreplug™).

2° - Capacidade vitrificante das soluções de vitrificação

Conhecendo a capacidade vitrificante de cada crioprotetor individualmente (1° etapa), vinte e quatro soluções de vitrificação foram formuladas e testadas para sua habilidade em atingir o estado vítreo, utilizando os mesmo dispositivos já mencionados.

3° - Toxicidade das soluções de vitrificação

Tendo crio-soluções com vitrificação comprovada, a próxima etapa foi avaliar a toxicidade dessas soluções sobre os folículos ovarianos de zebrafish. Nessa etapa foram estabelecidos os tempos de equilíbrio e incubação, a forma de exposição dos folículos às soluções de vitrificação e a forma de remoção dos crioprotetores. A toxicidade das soluções foi avaliada com base na integridade de membrana dos folículos ovarianos, utilizando o método de coloração vital com *trypan blue*.

4° - Vitrificação dos folículos ovarianos

O somatório das etapas anteriores culmina no estabelecimento do protocolo de vitrificação. Depois de testada a capacidade vitrificante dos crioprotetores, formuladas as soluções de vitrificação e avaliada sua toxicidade, atingimos o processo de vitrificação propriamente dito. Nesta etapa os folículos ovarianos foram vitrificados utilizando os diferentes dispositivos, e estocados em nitrogênio líquido para posteriores análises.

5° - Viabilidade dos folículos ovarianos após a vitrificação

Monitorar a viabilidade dos folículos ovarianos antes e após a vitrificação é vital para o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação bem sucedido. Três métodos foram utilizados para avaliar a viabilidade pós-vitrificação:

a) Análise da integridade de membrana:

A primeira metodologia a ser empregada foi a análise de integridade de membrana usando um corante vital. A coloração com *trypan blue* é fácil, rápida, pode ser utilizada para oócitos em qualquer estágio de desenvolvimento e fornece resultado imediato.

b) Avaliação da concentração citoplasmática de ATP:

Apesar de a coloração com *trypan blue* ser um método rápido e comumente utilizado, ela só fornece informações sobre a integridade da membrana, e isso não é suficiente para afirmar que um folículo ovariano permanece viável após ser exposto a um protocolo de criopreservação. A fim de fornecer uma avaliação mais precisa da viabilidade dos folículos ovarianos após a vitrificação, levando em consideração não só a integridade de membrana mas o status fisiológico em nível subcelular, a concentração citoplasmática de ATP foi medida após a vitrificação usando um teste de bioluminescência. O ATP é um nucleotídeo vital para a sobrevivência do oócito, seu desenvolvimento normal, e sua concentração é um importante parâmetro para avaliar a viabilidade celular.

c) Avaliação da integridade mitocondrial:

A fim de investigar a integridade e atividade mitocondrial nos folículos após a vitrificação nós utilizamos a sonda JC-1 associada à microscopia confocal. JC-1 é uma sonda fluorescente lipofílica catiônica que é internalizada pelo funcionamento das mitocôndrias e permite determinar o status metabólico e a distribuição (organização) das mitocôndrias ao mesmo tempo.

Local de desenvolvimento da pesquisa:

É importante destacar que esta Tese é fruto do Programa Institucional de Bolsas de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Todos os experimentos foram realizados durante o período de um ano (agosto/2011 a julho/2012) junto ao LIRANS Institute of Research in the Applied Natural Sciences, na University of Bedfordshire (Reino Unido), sob a supervisão da Dr^a Tiantian Zhang.

³CAPÍTULO II

³ Artigo redigido de acordo com as normas do periódico Theriogenology

**VITRIFICATION OF STAGE III ZEBRAFISH (*Danio rerio*) OVARIAN
FOLLICLES**

Leandro Cesar Godoy^a, Danilo P. Streit Jr^a, Tiziana Zampolla^b, Adriana Bos-
Mikich^a, Tiantian Zhang^{c,*}

^a *Aquam research group, Department of Animal Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 91540-000, Brazil, godoyaqua@yahoo.com.br*

^b *Institute of Biomedical and Environmental Science and Technology, University of Bedfordshire, Luton, Bedfordshire, LU2 8DL, UK*

^c *School of Applied Sciences, Bournemouth University, Dorset, BH12 5BB, UK*

** Corresponding author: School of Applied Sciences, Bournemouth University, Poole House, Talbot Campus, Fern Barrow, Poole, Dorset, BH12 5BB, UK*

Tel: +44 (0) 1202 965721

Email address: tzhang@bournemouth.ac.uk (T. Zhang)

Abstract

The possibility to create cryobanks of sperm, oocytes and embryos that retain full viability following recovery from the cryopreserved reproductive material would provide an effective tool for wildlife conservation as well as broodstock management in aquaculture. Cryopreservation of fish embryos has been under investigation for over two decades; however every tested protocol has failed. The use of oocytes has more recently been reported as an alternative, nevertheless most of the studies were carried out using a single technique - controlled slow cooling - and success also remains elusive. Vitrification is an ice-free cryopreservation method which offers several advantages that may contribute to overcome some of the difficulties involved with fish oocytes cryopreservation. In the present study we developed a vitrification protocol for stage III zebrafish ovarian follicles in ovarian tissue fragments. A series of cryo-solutions were designed and tested for their vitrifying ability using different devices (plastic straw, vitrification block and fibreplugTM). Toxicity of vitrification solutions was evaluated by assessing membrane integrity with trypan blue staining. In addition, we investigated the effect of vitrification protocol on the follicles at sub-cellular level by measuring the cytoplasmic ATP content and the mitochondrial distribution and activity using JC-1 probe and confocal microscopy. After vitrification, ovarian follicles showed membrane integrity of $59.9 \pm 18.4\%$ when fibreplug and V₁₆ (1.5 M methanol + 4.5 M propylene glycol) solution were employed. When vitrified in V₂ (1.5 M methanol + 5.5 M DMSO) the membrane integrity decreased to $42.0 \pm 21.0\%$. We observed that follicles located in the middle of the fragments were more protected from injuries and

some of them showed good morphological appearance two hours post-warming. Mitochondria integrity of granulosa cells layer was clearly damaged by the vitrification protocol and ATP level in the follicles declined significantly after warming. Vitrification of stage III zebrafish follicles in ovarian tissue fragments and its effect at sub-cellular level is reported here for the first time. Information gained from this study will help in guiding development of optimal protocol for cryopreservation of fish oocytes.

Keywords: Fish gamete; Maternal genome; Mitochondria; Cryobanking; Breeding program.

1. Introduction

The importance of animal genetic resources for wildlife maintenance as well as farming production has become more and more evident in recent years. Fish stocks are globally threatened mainly due to overfishing and environmental pollution [1,2]. Aquaculture has consequently become an important activity for high quality food production in order to meet the growing protein demand globally, and at the same time protects the wild fish populations from being overexploited [3].

Conservation programmes for wild and cultured fish have been established worldwide in order to protect them from becoming extinct [3]. Cryopreservation of aquatic germplasm brings the possibility of preserving the genome of endangered species, increasing the representation of genetically valuable animals for farming purposes and avoiding genetic losses through diseases and catastrophes [4].

For majority of the species, cryopreservation of embryos at any developmental stages still represents major challenges. According to Saragusty and Arav [5], whereas thousands and thousands of offspring were born following the transfer of frozen-thawed embryos in humans, cattle and mice, success is very limited in many other, even closely related species. In fish, successful cryopreservation of semen from many species including salmonids, cyprinids, cichlids, silurids, acipenserids, anastomids and characids has been well documented [6-10] and cryopreserved semen has been used for reproduction of many wild and farmed species [11]. However cryopreservation of spermatozoa preserves only the paternal genome and is not sufficient for

preservation of genetic diversity which depends also on the maternal genome [12]. Attempts to cryopreserve fish embryos have been conducted over the past three decades, nevertheless successful cryopreservation protocol for long-term storage still remains elusive [13-17].

Fish, reptiles, birds and amphibian embryos are multicompartmentalized, and there are several barriers that have been identified as a hamper for successful fish embryo cryopreservation: their high yolk content, large size, low permeability of the membranes and their high sensitivity to chilling [18].

It has recently been reported [19] that the use of oocytes may offer some advantages when compared to fish embryos, mainly due to the absence of a fully formed chorion, their smaller size resulting in higher surface to volume ratio and higher membrane permeability, therefore improving the chances of a successful cryopreservation.

Although several studies have been carried out on fish oocytes cryopreservation [19-23], all of them used controlled slow cooling protocol and success remains elusive as for embryos. Only one study, carried out by Guan et al [24] reported the use of vitrification for isolated stage III zebrafish ovarian follicles, however the ovarian follicles viability obtained after vitrification was highly compromised.

Despite the successful use of vitrification technique for oocytes cryopreservation in humans [25] and some domestic mammals [8,26], vitrification of fish oocytes has been almost unexplored to date. Vitrification is an ice-free cryopreservation method using high concentrations of cryoprotectants (CPAs) and ultra-rapid cooling rates [27] which offers advantages that may

contribute to overcome some of the difficulties associated with the slow cooling protocols.

The present study aimed at developing a cryopreservation protocol for stage III zebrafish ovarian follicles in tissue fragments using vitrification. A series of cryo-solutions were designed and tested for their vitrifying ability employing different vitrification devices. Toxicity of the vitrification solutions was evaluated by assessing ovarian follicle membrane integrity with trypan blue staining. In addition, we investigated the effect of vitrification protocol on the follicles at sub-cellular level by measuring the cytoplasmic ATP content and the mitochondrial distribution and activity using JC-1 fluorescent probe and confocal microscopy.

2. Materials and Methods

2.1. Vitrifying tendency of single cryoprotectant

L-15 Medium (Leibovitz) was developed in 1963 and originally formulated for use in carbon dioxide (CO₂) free systems requiring sodium bicarbonate supplement. L-15 is buffered by its complement of salts, free base amino acids and galactose substituted for glucose to help maintaining physiological pH control. When properly supplemented, L-15 Medium supports established cell lines, such as HEP-2 and LLC-MK2, as well as primary explants of embryonic and adult human tissue.

Leibovitz L-15 was chosen as the base medium for preparing all cryoprotectant solutions tested in our experiment, based on previous studies carried out by Guan et al [24] and by Seki et al [28]. To make the medium,

Leibovitz L-15 (Sigma) was diluted to 90% and the pH was adjusted to 9.0 using NaOH.

Vitrifying tendency of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide (DMSO), propylene glycol and ethylene glycol solutions made up in L-15 medium was tested at the following range of concentrations (Table 1).

Table 1

Concentrations of single cryoprotectants tested in the vitrification study.

Cryoprotectant	Concentration (Mol/L)						
Methanol	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0	10.5	11.0
Ethanol	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0	10.5	11.0
DMSO	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
Propylene glycol	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5
Ethylene glycol	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0

Cryo-solutions were tested for vitrification by using three different devices:

Plastic straw: 0.25 ml plastic straws were filled at room temperature (22 °C) by suction with a 5 ml syringe. The loaded straws were plunged directly into liquid nitrogen, held for 1 min and then the warming was performed by plunging the straws into a water bath maintained at 28 °C.

Vitrification Block™: by using a pipette, a 5 µl droplet was transferred to the hook at the end of a custom designed fibre named Fibreplug™ (CryoLogic Ltd, Melbourne). The vitrification block was chilled to liquid nitrogen temperature and the fibreplug holding a microdrop was placed on the chilled surface directly,

where it was held for 1 min. Warming was carried out by placing the glassy droplet on the fibreplug into pre-warmed L-15 medium at 28 °C.

Fibreplug[™]: the fibreplug holding a 5µl droplet was plunged directly into liquid nitrogen, held for 1 min, and the warming procedure was performed as detailed for the vitrification block.

The transparent glassy appearance during cooling and warming was used to identify vitrified solution, and a milky appearance was used to identify crystallization or devitrification. Six replicates were used for each cryoprotectant concentration for each vitrification device tested, and the experiments were repeated three times.

2.2. Vitrifying ability of vitrification solutions

Twenty four vitrification solutions (VS) containing combinations of cryoprotectants at different concentrations were prepared in 90% L-15 medium for testing. Vitrifying ability of the single cryoprotectant solutions was taken into account when choosing the combinations to formulate the vitrification solutions (Table 2).

Methanol was used at 1.5 M based on previous tests performed in our laboratory, which showed no negative effect on zebrafish ovarian follicles viability after 30 min incubation [unpublished results]. Furthermore, sucrose and glucose were added as non-permeating CPAs in order to increase the solution's viscosity and therefore, aiding vitrification.

The transparent glassy appearance during cooling and the ability to remain vitreous during warming was also used to identify vitrified solutions. Six

replicates were used for each VS tested for each vitrification device, and the experiments were repeated three times.

Table 2

Individual concentration of cryoprotectants (Mol/L) in each vitrification solution tested.

Vitrification solution	MT	PG	DMSO	EG	SU	GLU
V ₁	1.5	4.0	-	-	-	-
V ₂	1.5	-	5.5	-	-	-
V ₃	1.5	-	-	6.5	-	-
V ₄	1.5	3.0	-	-	0.25	-
V ₅	1.5	-	4.5	-	0.25	-
V ₆	1.5	-	-	5.5	0.25	-
V ₇	1.5	3.0	-	-	-	0.25
V ₈	1.5	-	4.5	-	-	0.25
V ₉	1.5	-	-	5.5	-	0.25
V ₁₀	1.5	3.0	-	-	0.50	-
V ₁₁	1.5	-	4.5	-	0.50	-
V ₁₂	1.5	-	-	5.5	0.50	-
V ₁₃	1.5	3.0	-	-	-	0.50
V ₁₄	1.5	-	4.5	-	-	0.50
V ₁₅	1.5	-	-	5.5	-	0.50
V ₁₆	1.5	4.5	-	-	-	-
V ₁₇	1.5	-	6.0	-	-	-
V ₁₈	1.5	-	-	7.0	-	-
V ₁₉	1.5	3.5	-	-	0.50	-
V ₂₀	1.5	-	5.0	-	0.50	-
V ₂₁	1.5	-	-	6.0	0.50	-
V ₂₂	1.5	3.5	-	-	-	0.50
V ₂₃	1.5	-	5.0	-	-	0.50
V ₂₄	1.5	-	-	6.0	-	0.50

MT, methanol; PG, propylene glycol, DMSO, dimethyl sulfoxide; ET, ethylene glycol; SU, sucrose; GLU, glucose.

2.3. Fish care and ovarian follicles collection

Zebrafish were maintained in aerated and temperature-regulated (27 °C) water in 40 L aquaria under a light/dark photoperiod of 12/12 h. Fish were fed twice a day with TetraMin[®] dry flake food (Tetra, Germany) and live brine shrimp (*Artemia franciscana*) nauplii.

To obtain ovarian follicles, female zebrafish with fully grown bellies were anesthetized with a lethal dose of tricaine (0.6 mg/ml) followed by decapitation. Ovaries were immediately removed after decapitation and were gently placed into a Petri dish containing 90% Leibovitz L-15 medium (pH 9.0) supplemented with L-glutamine (Sigma). Ovarian tissue fragments containing stage III ovarian follicles were obtained manually by using forceps and fine needles under a dissecting microscope.

In this study, follicles of 0.50-0.69 mm in diameter, having an intrafollicular oocyte with a dark ooplasm and a well-marked cell outline (immature oocytes at late stage III, Fig. 1) were used, based on the criteria described by Selman et al. [29]. In each experiment, ovarian tissue fragments obtained from three females were randomly distributed to experimental groups. All procedures reported here were approved by the Ethics Committee of iBEST.

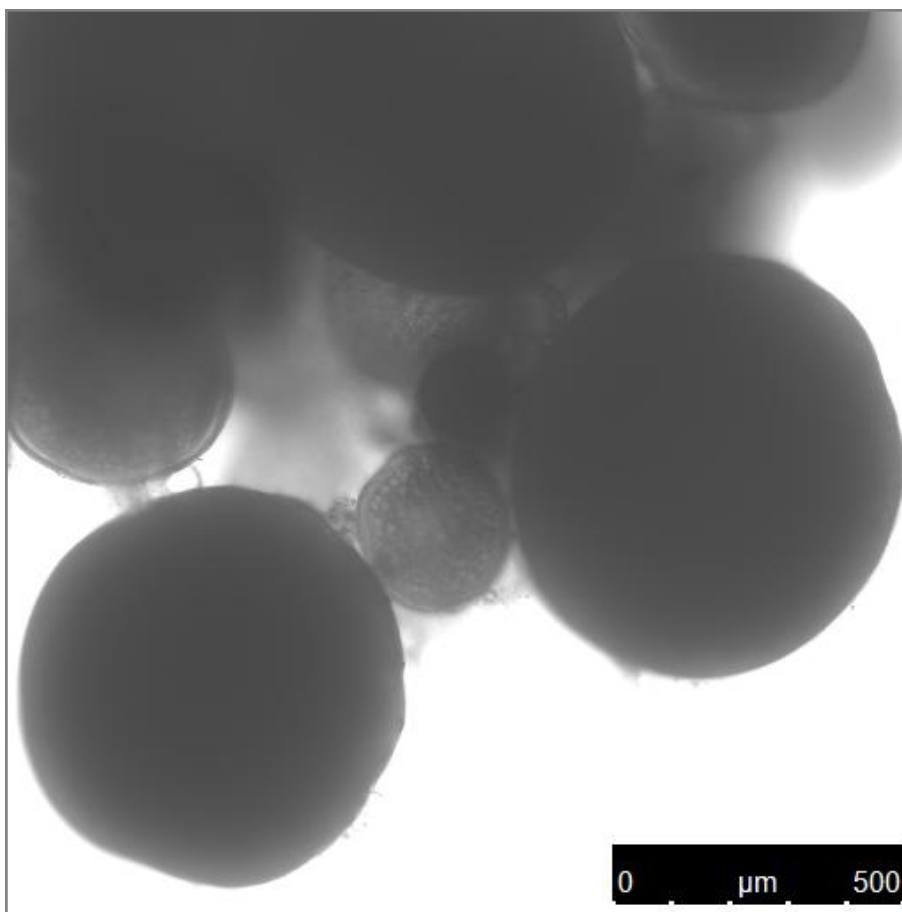


Fig. 1. Zebrafish ovarian tissue fragment containing immature ovarian follicles at late stage III used in the present study.

2.4. Toxicity of vitrification solutions

Following isolation, ovarian tissue fragments (3 x 2 mm) containing approximately 15 stage III follicles were randomly distributed in 6-well plates (3 fragments in each well). Firstly, follicles were equilibrated in L-15 medium containing 1.5 M methanol for 30 min at room temperature. After equilibration, follicles were exposed to vitrification solutions for 3 min in a stepwise manner: 1.5 min at 50% of the final VS concentration + 1.5 min at 100% VS concentration. Afterwards the CPAs were gradually removed in 3 steps (2 min

for each step), and ovarian follicles were washed three times in L-15 medium. Control ovarian follicles were kept in L-15 medium for 30 min at room temperature. In order to test the ovarian follicles viability after exposure to VS, trypan blue (TB) staining was used to assess membrane integrity (see details in section 2.6.1). For each vitrification solution three replicates were used and toxicity tests were repeated three times.

2.5. Vitrification of zebrafish ovarian follicles

For vitrification, ovarian tissue fragments were exposed to vitrification solutions as described above (section 2.4). Following incubation in vitrification solutions, ovarian follicles were vitrified using either plastic straws or fibreplug as described below:

Plastic straw: follicles were aspirated in 0.25 ml plastic straws by suction with a 5 ml syringe. The loaded straws were plunged directly into liquid nitrogen, and stored in liquid nitrogen for at least 20 min. Warming was performed by plunging the straws into a water bath at 28 °C. Ovarian follicles were then released into a glass plate containing pre-warmed (28 °C) vitrification solution, and CPAs were gradually removed in 3 steps (2 min for each step).

Fibreplug: ovarian follicles were transferred to the hook of the fibreplug which was vertically plunged in liquid nitrogen, held for 10 seconds and then placed into its pre-cooled plastic sleeves, sealed and stored for at least 20 min. Following storage in liquid nitrogen, fibreplugs were removed from the sleeves and rapidly immersed into a glass plate containing pre-warmed (28 °C)

vitrification solution, where the ovarian follicles were released. Removal of CPAs was carried out in 3 steps, 2 min for each step.

2.6. Assessing ovarian follicles viability after vitrification

2.6.1. Membrane integrity assay

Immediately after warming, ovarian follicles membrane integrity was assessed by using trypan blue (TB) staining. To carry out the TB assay, a 0.4% TB stock solution (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) was diluted to 0.2% in 90% L-15 medium. Ovarian follicles were stained for 3 min with 0.2% TB solution at room temperature, and then washed three times in 90% L-15 medium. Unstained ovarian follicles were considered as viable, while ovarian follicles stained blue were considered as non-viable [21,30]. Total ovarian follicles and viable ovarian follicles (not stained) counts were carried out under a light microscope.

2.6.2. Measurement of cytoplasmic ATP content

ATP content in the ovarian follicles was measured immediately after warming and 120 min later. For extract preparation the procedure described by Guan et al. [22] was employed. Briefly, two ovarian tissue fragments containing 30 stage III zebrafish ovarian follicles (15 follicles in each fragment) were added to 1 ml of an ice cold solution containing 0.5 M perchloric acid + 4 mM EDTA and homogenized with a conical glass pestle. The homogenate was centrifuged at 17,000 X g for 10 min at 4 °C in a refrigerated centrifuge. Supernatant was separated and neutralized with 2.5 M KOH to adjust the pH value to between 6 and 7. The neutralized supernatant was then centrifuged for 5 min at 8000 X g

and the new supernatant again collected. This extract was loaded into Eppendorf tubes and stored at -20 °C until the ATP determination. ATP released from follicles was measured using a commercial bioluminescence assay kit based on luciferin-luciferase reaction (FL-AA, Sigma-Aldrich, Dorset, UK) according to the manufacturer's instructions. A luminometer (TD-20/20 - Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA) was used for all measurements. Background light was measured and subtracted by running a blank containing deionised water. A seven-point standard calibration curve was routinely included in each assay. The ATP concentration was determined by the formula from the linear regression of the standard curve. Follicles from control (kept in L-15 medium at room temperature) and vitrified groups were used in triplicates and assays were repeated three times on three different days.

2.6.3. Mitochondrial integrity assay

In order to investigate mitochondrial distribution and activity in the ovarian follicles after vitrification, JC-1 (5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylimidacarbocyanine iodide), a membrane potential ($\Delta\Psi_m$) sensitive probe was used. JC-1 forms either green fluorescent monomers (depolarized) or red fluorescent aggregates (polarized), depending on the state of the mitochondria [31]. Two ovarian tissue fragments (containing approximately 15 follicles in each one) from control and vitrified groups were stained with JC-1 (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) according to the protocol described by Zampolla et al. [32]. A 1.5 mM stock solution of the dye was prepared in DMSO according to manufacturer's instructions. Follicles were exposed to 5 μ M of JC-1 in L-15

medium for 30 min at room temperature. Subsequently the follicles were washed three times with L-15 medium, transferred to a 35 mm glass bottom dish (WillCo Dish, INTRACEL, Shepreth, Royston, UK) and observed by confocal microscopy.

2.6.4. Confocal microscopy

Stained samples were examined using a Leica TCS-SP5 (Leica, Microsystems Ltd, Milton Keynes, Bucks, UK) confocal microscope. Mitochondrial activity and distribution were assessed through a series of optical sections. Objectives (X 20 and X 40), pinhole, filters, gain and offset were kept constant throughout the experiments. Laser excitation and emission filters for the labelled dye were as follows: JC-1 $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ (excitation), (green) $\lambda_{\text{em}} = 510/550 \text{ nm}$ (emission), (red), $\lambda_{\text{em}} = 580/610 \text{ nm}$ (emission). Digital images were obtained with Leica TCS-SP5 software and stored in TIFF format. Three replicates were used for each group (control and vitrified) and experiment was repeated three times on three different days.

2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using the software STATISTICA 6.0 (Statsoft 2001). Homogeneity of variances (Levene's test) and normality of the data distribution (Kolmogorov-Smirnov test) were tested. When data were normally distributed, comparisons among groups were tested by one-way ANOVA. Where differences were found Tukey's post-hoc test was performed in order to identify which groups differ. For data not normally distributed,

comparisons among groups were made by nonparametric Kruskal-Wallis test. Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD) across the three replicates and $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Vitrifying tendency of single cryoprotectants

The minimum vitrifying concentration of each cryoprotectant is presented in Table 3.

The results showed that methanol vitrified at 10.0 M only when the fibreplug was used. Ethanol did not vitrify at any concentration with any vitrification device tested. DMSO vitrified at 5.5 M in both plastic straw and fibreplug. Propylene glycol reached vitrification at 4.0 M in straws and at 5.0 M using fibreplug; and ethylene glycol vitrified at 6.5 M only in straw.

Table 3

Minimum vitrifying concentration (Mol/L) of single cryoprotectant using different devices.

Cryoprotectant	Vitrification device		
	Straw	Fibreplug™	Vitrification block
Methanol	C	10.0	C
Ethanol	C	C	C
DMSO	5.5	5.5	C
Propylene glycol	4.0	5.0	C
Ethylene glycol	6.5	C	C

C, crystallization resulted in milky appearance of the solution during cooling at the maximum concentration tested. Cryo-solutions were made up in 90% Leibovitz L-15 medium at pH 9.0.

In the present study, the use of the vitrification block did not allow to achieve vitrification with any of the cryo-solutions tested. Based on these results, the vitrification block was not used for subsequent experiments. Likewise, as ethanol did not vitrify with any of the vitrification devices and concentrations tested, it was not used for subsequent experiments.

3.2. Vitrifying ability of vitrification solutions

The results from these experiments are presented in Table 4, where each color represents the appearance of the solution evidenced throughout the experiments. Crystallization of the solution (in light gray) was more frequently recorded when 0.25 ml plastic straw was used. Most of the solutions vitrified during cooling; however devitrification was frequently evidenced during warming (in dark gray).

Among the 24 vitrification solutions, three of them remained vitreous (Table 4, in black color) during both cooling and warming procedures. V_2 , V_{16} and V_{21} solutions were therefore selected for toxicity studies.

Table 4

Vitrifying ability of the 24 vitrification solutions tested by using two different devices*.

		Vitrification solutions																								
		V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₅	V ₆	V ₇	V ₈	V ₉	V ₁₀	V ₁₁	V ₁₂	V ₁₃	V ₁₄	V ₁₅	V ₁₆	V ₁₇	V ₁₈	V ₁₉	V ₂₀	V ₂₁	V ₂₂	V ₂₃	V ₂₄	
Straw		Light gray	Light gray	Light gray	Dark gray	Light gray	Light gray	Dark gray	Light gray	Dark gray	Light gray	Dark gray	Dark gray	Dark gray	Dark gray	Dark gray	Light gray	Light gray	Light gray	Light gray	Light gray	Light gray	Black	Light gray	Light gray	Dark gray
Fibreplug™		Dark gray	Black	Dark gray	Light gray	Dark gray	Dark gray	Light gray	Dark gray	Dark gray	Dark gray	Dark gray	Dark gray	Dark gray	Dark gray	Dark gray	Black	Dark gray	Dark gray	Dark gray	Dark gray	Dark gray	Dark gray	Dark gray	Dark gray	Dark gray

*Each color in the table represents the appearance of the solution during cooling and warming procedures. Light gray: crystallization resulted in milky appearance of the solution during cooling. Dark gray: vitrification reached during cooling but devitrification was evidenced during warming. Black: vitrification was identified by transparent glassy appearance of the solution during cooling and no ice crystal formation during warming. The composition of each vitrification solution is given in Table 2.

3.3. Toxicity of vitrification solutions

The effect of toxicity of the vitrification solutions on the membrane integrity of zebrafish ovarian follicles is shown in Fig. 2. When ovarian follicles were exposed to V₂₁ solution the membrane integrity ($77.9 \pm 12.9\%$) did not differ ($P > 0.05$) from results obtained in the control group ($91.0 \pm 6.1\%$). Ovarian follicles exposed to V₁₆ and V₂ showed a decrease ($P < 0.05$) in membrane integrity compared to the control group ($73.9 \pm 9.8\%$ and $30.5 \pm 12.3\%$, respectively for V₁₆ and V₂).

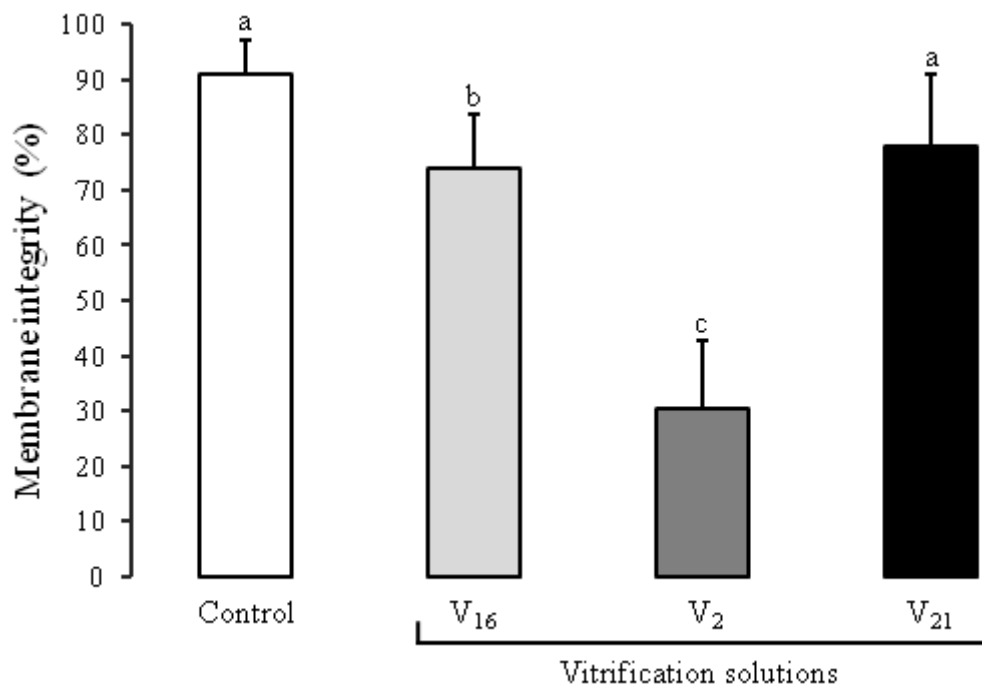


Fig. 2. Membrane integrity of stage III zebrafish ovarian follicles after equilibration for 30 min at room temperature in 90% L-15 medium containing 1.5 M methanol followed by exposure to vitrification solutions for 3 min in a stepwise manner: 1.5 min [50%] + 1.5 min [100%]. Cryoprotectants were removed in three steps and membrane integrity was assessed by using trypan blue staining. V₁₆ (1.5 M methanol + 4.5 M propylene glycol); V₂ (1.5 M methanol + 5.5 M DMSO); V₂₁ (1.5 M methanol + 6.0 M ethylene glycol + 0.5 M sucrose). Bars labelled with different letters indicate difference ($P < 0.05$) between control and treated groups (mean \pm SD).

3.4. Viability of zebrafish ovarian follicles after vitrification

3.4.1. Membrane integrity

The membrane integrity of stage III zebrafish ovarian follicles assessed by trypan blue staining after vitrification is shown in Fig. 3. There was significant difference in membrane integrity of ovarian follicles between the room

temperature control group and all the vitrified groups. Ovarian follicles showed membrane integrity of $59.9 \pm 18.4\%$ when fibreplug and V_{16} solution were employed. When ovarian follicles were vitrified in V_2 the membrane integrity decreased ($P < 0.05$) to $42.0 \pm 21.0\%$, using fibreplug as vitrification device. After vitrification in V_{21} solution using plastic straw the largest decrease in membrane integrity was recorded, with a value of only $2.1 \pm 3.6\%$. Based on these results, V_{21} solution was not used for the subsequent experiments.

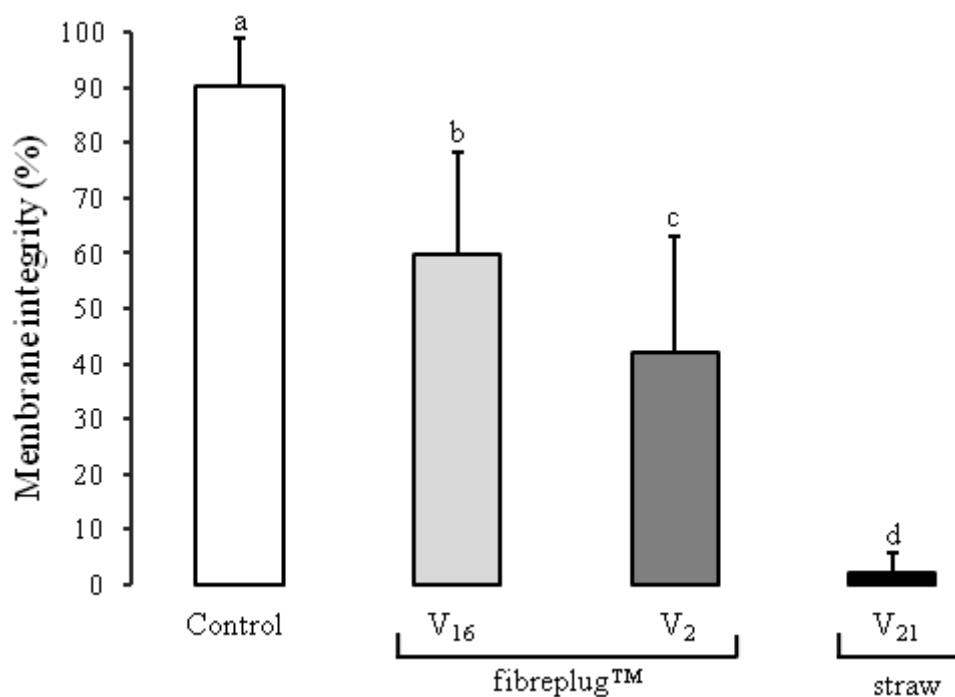


Fig. 3. Membrane integrity of stage III zebrafish ovarian follicles after vitrification in V_{16} , V_2 and V_{21} solutions. Trypan blue staining was used to assess membrane integrity immediately after warming. V_{16} (1.5 M methanol + 4.5 M propylene glycol); V_2 (1.5 M methanol + 5.5 M DMSO); V_{21} (1.5 M methanol + 6.0 M ethylene glycol + 0.5 M sucrose). Bars labelled with different letters indicate difference ($P < 0.05$) between control and treated groups (mean \pm SD).

3.4.2. Cytoplasmic ATP concentration in the ovarian follicles

The ATP concentration in the follicles declined significantly ($P < 0.05$) after vitrification. To make the comparisons clearer we normalised the data considering the ATP measured in the control group as 100% (Fig. 4). Soon after warming, the ATP in the follicles vitrified in V_2 declined to $22.0 \pm 4.23\%$. Likewise, the ATP in ovarian follicles vitrified in V_{16} dropped to $6.9 \pm 0.6\%$ (Fig. 4). Nevertheless, when measured 120 min post-warming the ATP in the ovarian follicles vitrified in V_2 ($15.1 \pm 2.8\%$) did not differ ($P > 0.05$) to the ATP concentration recorded immediately after warming. In contrast, a decrease over time was observed in the follicles vitrified in V_{16} ($3.5 \pm 0.7\%$).

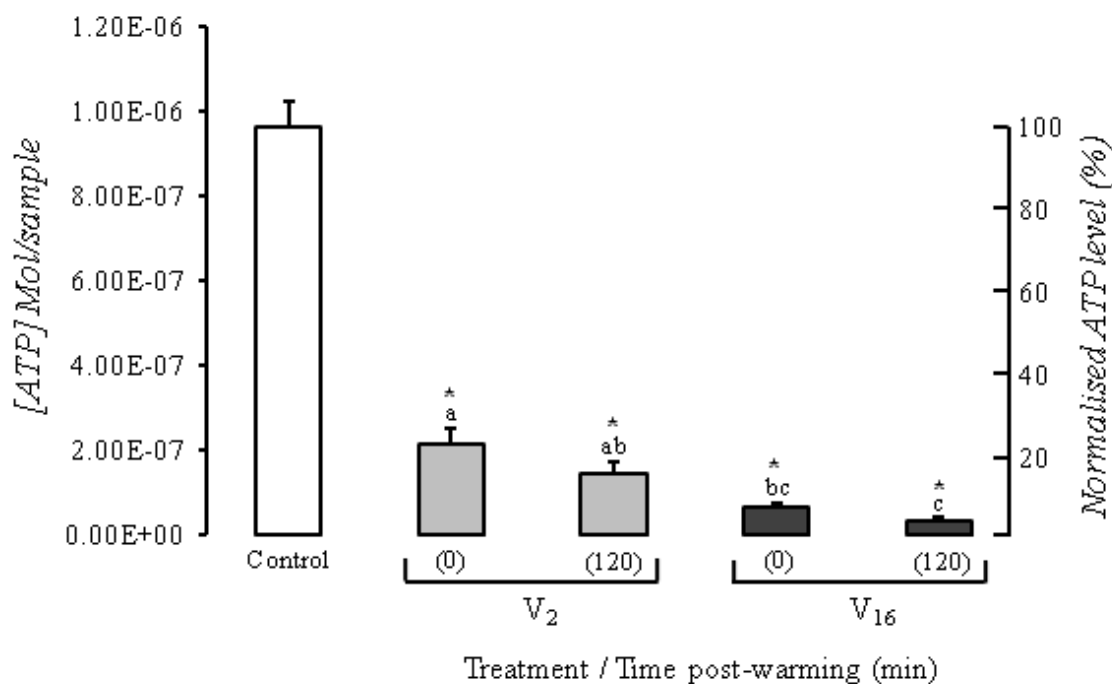


Fig. 4. ATP concentration in stage III zebrafish ovarian follicles after vitrification. Measurement was made immediately after warming (time zero) and 120 min post-warming. V_2 (1.5 M methanol + 5.5 M DMSO); V_{16} (1.5 M methanol + 4.5 M propylene glycol). Error bars represent standard error of mean. Groups with no common superscript letter differ significantly from each other ($P < 0.05$). *, significantly different from control group.

3.4.3. Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and distribution

The photomicrographs shown in Fig. 5 are representative examples of ovarian follicles obtained by confocal microscopy after exposure to JC-1 fluorescent probe. JC-1 was unable to penetrate deep inside the oocytes, therefore the fluorescence remained concentrated at the margins of the granulosa cells layer (Fig. 5A_I and A_{II}).

Ovarian follicles from the control group displayed a contiguous peripheral aggregation of mitochondria in the granulosa cells that surround the oocytes, with a well-organized distributional arrangement and red fluorescence emission (Fig. 5A_I and A_{II}). Images from the vitrified groups showed a complete loss of mitochondrial structure pattern as well as loss of fluorescence, indicating that the vitrification protocol caused loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) (Fig. 5B and C).

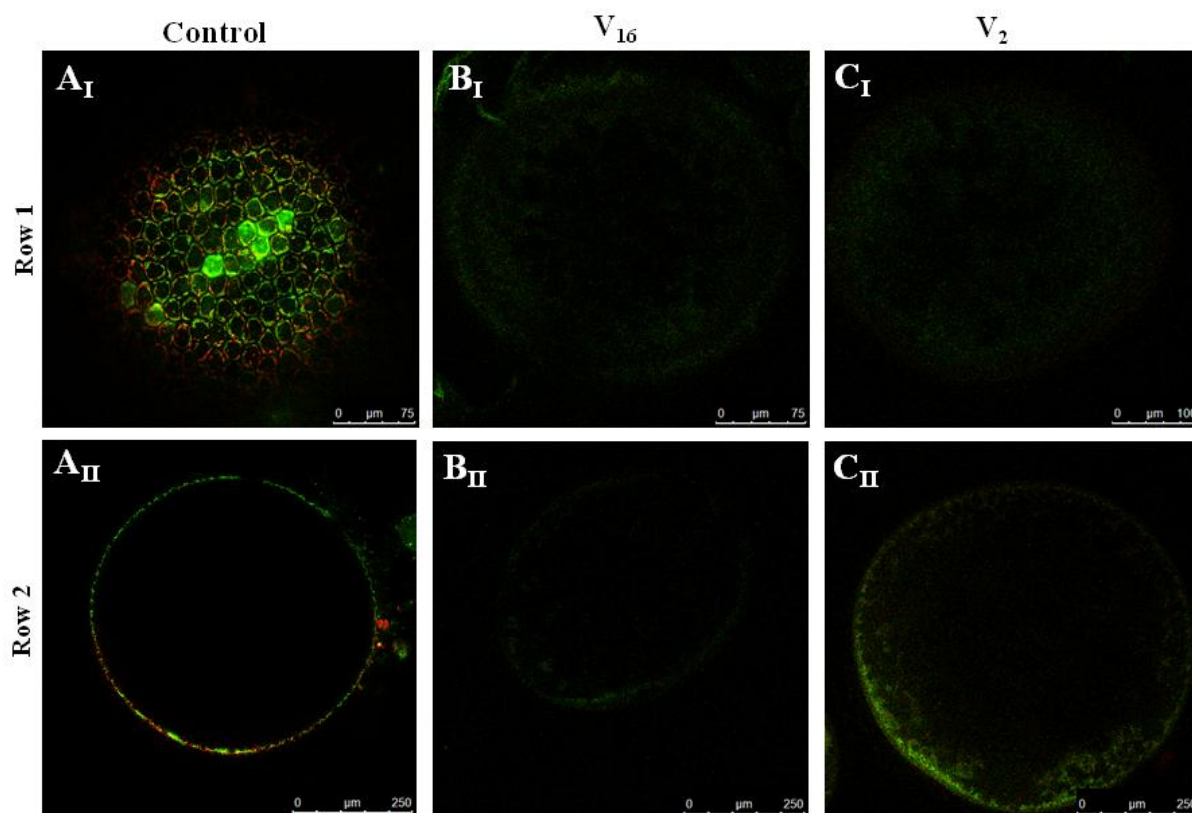


Fig. 5. Effect of vitrification on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and mitochondrial distribution in stage III zebrafish ovarian follicles. Follicles were exposed to 5 μM of JC-1 in L-15 medium for 30 min immediately after warming. JC-1 is a sensitive marker for mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), it stains mitochondria with low $\Delta\Psi_m$ in green, while higher polarized mitochondria fluoresce red. First row images show view of the granulosa cells layer of the ovarian follicles. Second row images show view of the ovarian follicles optical section. Control group (A_I and A_{II}) shows mitochondria with both red and green fluorescence as well as a well-organized distributional arrangement. Vitrified groups (B and C) show loss of structural organization and the absence of fluorescence indicates loss of $\Delta\Psi_m$.

4. Discussion

Assessment of the minimum concentration of a cryoprotectant required to vitrify is the very first step in designing cryo-solutions to be used for a vitrification protocol.

In this study we examined the vitrifying ability of cryo-solutions using five permeating CPAs and three different vitrification devices. The results showed that 0.25 ml plastic straw and fibreplug provided better results than the vitrification block. Whether vitrification occurs is dictated by the composition of the vitrification solution and other factors including the cooling and warming rates [33]. Thus, a solution which vitrifies in one device may form ice crystals when used under other conditions. Vitrification occurs most readily at high cooling and warming rates, and it is possible that the lower cooling rates on vitrification block surface resulted in the crystallization of all tested solutions when this device was employed.

The permeating CPAs used in the present study were chosen based on the previous studies carried out in our laboratory on cryopreservation of zebrafish embryos and oocytes by using controlled slow cooling protocols (19-22,32,34). Despite the recent report of Anil et al [34] showing ethanol as a promising CPA to be used in zebrafish ovarian follicles cryopreservation, i.e. less toxic when compared to methanol, it did not vitrify at the maximum concentration (11 M) tested in our study. Thus, ethanol was not included when designing the vitrification solutions.

Methanol is well known for its rapid penetration through cell membranes and low toxicity for fish gametes and embryos [11,35,36]; however at the

concentration required to achieve vitrification (10 M) it becomes very toxic. Zampolla et al [30,32] reported that concentrations of methanol below 2 M do not affect viability of zebrafish ovarian follicles after incubation for 30 min at 22 °C. Therefore, we used 1.5 M methanol as an equilibrating CPA in the vitrification solutions.

Among the vitrification solutions tested in 0.25 ml plastic straws, only V₂₁ vitrified during cooling and remained vitreous when warmed. The CPAs concentration of 59.17% (w/v) in this solution, achieved by the combination of two permeating (methanol and ethylene glycol) and a non-permeating (sucrose) cryoprotectant contributed to its successful vitrification. The combination of two or three permeating CPAs and a non-permeating (normally sugars) cryoprotectant has been shown to be beneficial in increasing viscosity and glass transition temperature (T_g) of solutions [8], therefore improving the chance of vitrification as well as reducing the toxicity of a CPA. Kuleshova et al [37] assessed the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions by replacing ethylene glycol with an equimolar concentration of six different sugars. Their results showed that the T_g of the solutions rose as the proportions of these sugars in the vitrification solution increased.

The results from the present study showed that solutions were better vitrified using fibreplug when compared to 0.25 ml plastic straws. It has been shown in the literature that the most effective way for increasing cooling rates is to use the smallest possible volume of cryoprotectant solution in order to establish a direct contact (without any thermal insulating layer) between the

solution and the liquid nitrogen [38]. A smaller volume may also offer a special advantage: it prevents heterogeneous ice formation.

In zebrafish, it has been shown that methanol and propylene glycol are less toxic to stage III oocytes than other cryoprotectants, such as ethylene glycol and DMSO [21,39]. This explains the higher membrane integrity of ovarian follicles after exposure to V_{16} solution (1.5 M methanol + 4.5 M propylene glycol) when compared to the results ($30.5 \pm 12.3\%$) recorded for the follicles exposed to V_2 (1.5 M methanol + 5.5 M DMSO). DMSO at 5.5 M became toxic to stage III zebrafish ovarian follicles. Although ethylene glycol is considered to be the most toxic among the CPAs used in this experiment [40], ovarian follicles exposed to V_{21} (1.5 M methanol + 6.0 M ethylene glycol + 0.5 M sucrose) displayed the highest membrane integrity of all treated groups. The presence of sucrose may have lowered the toxicity of ethylene glycol and worked as an osmotic buffer stabilizing the follicles membrane and consequently preserved its integrity. Studies have shown that the use of sucrose as non-permeating CPA provides additional protection to membranes from the consequences of dehydration in fish embryos and optimizes the performance of permeable CPAs when used in combination [11,14,35,41,42].

The present study showed that the membrane integrity of ovarian follicles after vitrification, assessed by TB staining, was not preserved when using plastic straws. This result suggests that intracellular ice crystal formation may have taken place during vitrification process. No changes were observed in solution appearance in the straws during both cooling and warming procedures; however, even transparent solutions may contain countless ice nuclei and ice

crystals, because the ice crystals only are detectable optically once they become larger than the wavelength of light [43].

The volume of the vitrification solution was minimized when fibreplug was used, increasing the probability of vitrification, which may have contributed to the higher membrane integrity of the ovarian follicles vitrified in V_{16} and V_2 .

Guan et al [24] reported a slightly higher membrane integrity after vitrification of isolated stage III zebrafish ovarian follicles than the results obtained here using ovarian fragments, when assessed by TB staining. However, in the present study the viable follicles found in V_{16} and V_2 remained opaque and morphologically intact, when assessed immediately after warming. These results are different to those described by Guan et al. [24], where zebrafish follicles were observed to become swollen and translucent even during the warming process, with membrane ruptured within the following ten minutes. Such phenomenon was also previously reported by Guan et al [22] using controlled slow cooling protocol and by Isayeva et al [20] in studies on chilling sensitivity of zebrafish ovarian follicles. In order to obtain more information relating to this phenomenon, ovarian follicles appearance was observed throughout the two hours following warming, under incubation in L-15 medium at room temperature. Thirty minutes after warming most of the follicles started to become semi-translucent and slightly swollen, indicating some changes in the structure of yolk. A translucent appearance of the follicle occurs naturally during its maturation in zebrafish (germinal vesicle breakdown - GVBD) and is associated with the proteolysis of yolk during stage IV. It is possible that the oocyte internal compartments were damaged during

vitrification, releasing proteases (e.g. cathepsins) or affecting ion transport mechanisms that eventually change the physical structure of the yolk proteins.

We observed that the follicles located in the middle of the fragments (± 1 mm from the border) were more protected from injuries and some of them displayed good appearance (outlined cell membrane and opacity) even two hours after warming. This is a promising finding, however there is clearly a need for further investigation regarding the metabolic status and developmental capability of these follicles.

Although TB staining is a fast and common method [21,30] for assessing the viability of fish ovarian follicles, it only provides information on the membrane integrity and does not give information on follicle development capability. In order to provide a more accurate assessment of ovarian follicle viability after vitrification, at sub-cellular level: taking into account that mitochondria of cells are very vulnerable to low temperature injuries [44] and considering the essential role that ATP plays in gamete maturation [45], measurement of ATP content in the ovarian follicles was performed. We carried out this assay immediately after warming and after 120 min incubation, taking into consideration the latent injury [46]. Results obtained immediately after warming can be misleading because injuries may be latent in character and, while escaping detection during initial tests of vital function, may be manifested later with the passage of time after warming, during which affected cells become altered sufficiently to reflect their earlier undetected or subthreshold injury [46].

While ovarian follicles vitrified in V_{16} showed higher membrane integrity compared to those vitrified in V_2 solution, the ATP assay showed a lower concentration of ATP in the follicles which were vitrified using V_{16} solution. These results point out that despite $59.9 \pm 18.4\%$ of the ovarian follicles vitrified in V_{16} displayed intact membranes, the integrity of the mitochondria in most follicles was disrupted, explaining their reduced ATP content. The energy status of oocytes is critical for their maturation and ATP level has been suggested to be used as an indicator for the developmental potential [45]. The ATP levels in ovarian follicles determined in our study after vitrification were much higher than those reported by Guan et al [22] for stage III zebrafish follicles using a controlled slow cooling protocol, either immediately after warming (1.7%) or 2 h later (0.4%).

Use of JC-1 allows both mitochondrial metabolic status and distribution to be determined at the same time. The negative charge established by the mitochondrial membrane potential allows the lipophilic dye, bearing a delocalized positive charge, to enter the mitochondrial matrix where it accumulates [47]. When the critical concentration is exceeded J-aggregates form, resulting in red fluorescence emission [31], which was evidenced in the ovarian follicles from the control group. In addition, mitochondria showed arrangement as a hexagonal-polygonal pattern at the margin of each granulosa cell, as previously reported by Zampolla et al [48].

Results from confocal microscopy were consistent with the data obtained by the ATP assay. The losses in mitochondrial spatial pattern as well as mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) evidenced that the granulosa cells

layer of stage III zebrafish ovarian follicles are particularly sensitive to subzero temperature exposure. Mitochondria integrity of granulosa cells layer was clearly damaged by the vitrification protocol, which explains the significant decline of ATP level in the follicles after warming. These findings show that ATP bioluminescence assay combined with JC-1 staining provides an accurate assessment of ovarian follicles viability after vitrification.

Vitrification of stage III zebrafish follicles in ovarian tissue fragments with detailed cryobiological information at sub-cellular level is reported here for the first time.

In summary, fish ovarian follicles are a complex biological material to cryopreserve and a lot of further studies are necessary. We believe that the information gained from this study will be very useful to guide development of a successful protocol for cryopreservation of fish oocytes in the future.

Acknowledgements

Leandro Godoy was awarded a visiting PhD student fellowship from the CAPES Foundation - Brazilian Ministry of Education - to spend one-year period in the UK. In Brazil the author was supported by CNPq. This research was funded by the LIRANS strategic research fund (University of Bedfordshire - UK).

References

- [1] IUCN. The IUCN red list of threatened species. Gland, Switzerland, and Cambridge, UK: International Union for Conservation of Nature. 2003. Available at <http://www.iucnredlist.org>
- [2] Rawson DM, McGregor Reid G, Lloyd RE. Conservation rationale, research applications and techniques in the cryopreservation of lower vertebrate biodiversity from marine and freshwater environments. *Int Zoo Yb* 2011;45:1-16.
- [3] FAO. World aquaculture 2010. Fisheries and Aquaculture Department. Technical Paper N° 500/1. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2011.
- [4] Ballou JD. Potential contribution of cryopreserved germ plasm to the preservation of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity. *Cryobiology* 1992;29:19-25.
- [5] Saragusty J, Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction* 2011;141:1-19.
- [6] Blaxter JHS. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature* 1953;172:1189-90.
- [7] Caffey RH, Tiersch TR. Cost analysis for integration of sperm cryopreservation into an existing fish hatchery. *J World Aquacult Soc* 2000;31:51-8.
- [8] Carolsfeld J, Godinho HP, Zaniboni-Filho E, Harvey BJ. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *J Fish Biol* 2003;63:472-89.

- [9] Tiersch TR, Yang H, Jenkins JA, Dong Q. Sperm cryopreservation in fish and shellfish. *Society of Reprod Suppl* 2007;65:493-508.
- [10] Streit Jr DP, Sirol RN, Ribeiro RP, Moraes GV, Vargas LDM, Watanabe AL. Qualitative parameters of the piapara semen (*Leporinus elongatus* Valenciennes, 1850). *Braz J Biol* 2008;68:373-77.
- [11] Fornari DC, Ribeiro RP, Streit Jr DP, Vargas L, Godoy LC, Oliveira CAL, et al. Increasing storage capability of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos by chilling: development of a useful methodology for hatcheries management. *CryoLetters* 2012;33:125-33.
- [12] Zhang T, Rawson DM, Pekarsky I, Blais I, Lubzens E. Low-temperature preservation of fish gonad cells and oocytes. In: Babin PJ, Cerdà J, Lubzens E, editors. *The fish oocyte: from basic studies to biotechnological applications*, Dordrecht: Springer; 2007, p. 411-36.
- [13] Harvey B. Cooling of embryonic cells, isolated blastoderms, and intact embryos of the zebrafish *Brachydanio rerio* to -196 degrees C. *Cryobiology* 1983;20:440-47.
- [14] Zhang T, Rawson DM, Morris GJ. Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Aquat Living Resour* 1993;6:145–53.
- [15] Hagedorn M, Kleinhans F. Problems and prospects in cryopreservation of fish embryos. In: Tiersch TR, Mazik PM, editors. *Cryopreservation in Aquatic Species*, Baton Rouge: World Aquaculture Society; 2000, p. 161-78.

- [16] Cabrita E, Robles V, Chereguini O, Wallace JC, Herráez MP. Effect of different cryoprotectants and vitrification solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). *Cryobiology* 2003;47:204-13.
- [17] Edashige K, Valdez DM, Hara T, Saida N, Seki S, Kasai M. Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos are difficult to cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 2006;53:96-106.
- [18] Rall WF. Recent advances in the cryopreservation of salmonid fishes. In: Cloud JG, Thorgaard GH, editors. Genetic conservation of salmonid fishes, New York: Plenum; 1993, p. 137-58.
- [19] Tsai S, Rawson DM, Zhang T. Development of cryopreservation protocols for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles using controlled slow cooling. *Theriogenology* 2009;71:1226–33.
- [20] Isayeva A, Zhang T, Rawson DM. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. *Cryobiology* 2004;49:114–122.
- [21] Plachinta M, Zhang T, Rawson DM. Preliminary studies on cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) vitellogenic oocytes using controlled slow cooling. *Cryobiology* 2004;49:347.
- [22] Guan M, Rawson DM, Zhang T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes using improved controlled slow cooling protocols. *Cryobiology* 2008;56:204-8.
- [23] Lubzens E, Pekarsky I, Blais I, Cionna C, Carnevali O. Cryopreservation of oocytes from a marine fish: achievements and obstacles. *Cryobiology* 2005;51:385.

- [24] Guan M, Rawson DM, Zhang T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes by vitrification. *CryoLetters* 2010;31:230-38.
- [25] Kim TJ, Hong SW. Successful live birth from vitrified oocytes after 5 years of cryopreservation. *J Assist Reprod Genet* 2011;28:73-6.
- [26] Vajta G, Kuwayama M, Booth PJ, Holm P, Greve T, Callesen H. Open pulled straw (OPS) vitrification of cattle oocytes. *Theriogenology* 1998;49:176.
- [27] Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification. *Nature* 1985;24:387-402.
- [28] Seki S, Kouya T, Tsuchiya R, Valdez Jr DM, Jin B, Hara T, Saida N, Kasai M, Edashige K. Development of a reliable in vitro maturation system for zebrafish oocytes. *Reproduction* 2008;135:285–92.
- [29] Selman K, Wallace RA, Sarka A, Qi X. Stages of oocyte development in the zebrafish *Brachydanio rerio*, *J Morphol* 1993;218:203-24.
- [30] Zampolla T, Zhang T, Rawson DM. Evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicle viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate and propidium iodide. *CryoLetters* 2008;29:463-75.
- [31] Reers M, Smiley ST, Mottola-Hartshorn C, Chen A, Lin M, Chen LB. Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Methods Enzymol* 1995;260:406-17.
- [32] Zampolla T, Spikings E, Zhang T, Rawson DM. Effect of methanol and Me₂SO exposure on mitochondrial activity and distribution in stage III ovarian follicles of zebrafish (*Danio rerio*). *Cryobiology* 2009;59:188-94.

- [33] Mazur P, Leibo SP, Seidel Jr GE. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. *Biol Reprod* 2008;78:2-12.
- [34] Anil S, Zampolla T, Zhang T. Development of *in vitro* culture method for zebrafish ovarian tissue fragment. *Cryobiology* 2011;63:311.
- [35] Streit Jr DP, Digmayer M, Ribeiro RP, Sirol RN, Moraes GV, Galo JM. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 2007;42:1199-202.
- [36] Fornari DC, Ribeiro RP, Streit Jr DP, Godoy LC, Neves PR, Oliveira D, et al. Effect of cryoprotectants on the survival of cascudo preto (*Rhinelepis aspera*) embryos stored at -8 °C. *Zygote* 2011, (*FirstView*), DOI:10.1017/S0967199411000517.
- [37] Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO, Shaw JM. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology* 1999;38:119-30.
- [38] Yavin S, Arav A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology* 2007;67:81-9.
- [39] Seki S, Kouya T, Tsuchiya R, Valdez Jr DM, Jin B, Koshimoto C, Kasai M, Edashige K. Cryobiological properties of immature zebrafish oocytes assessed by their ability to be fertilized and develop into hatching embryos. *Cryobiology* 2011;62:8-14.
- [40] Zampolla T, Spikings E, Srirangarajah S, Rawson DM, Zhang T. Impact of cryoprotectants and cryopreservation on metabolic activity and cytoskeleton

proteins of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian fragments. *CryoLetters* 2011;32:525-36.

- [41] Ahammad MM, Bhattacharyya D, Jana BB. Effect of different concentrations of cryoprotectant and extender on the hatching of Indian major carp embryos (*Labeo rohita*, *Catla catla*, and *Cirrhinus mrigala*) stored at low temperature. *Cryobiology* 1998;37:318-24.
- [42] Neves PR, Ribeiro RP, Streit Jr DP, Natali MRM, Fornari DC, Santos AI, Godoy LC. Injuries in pacu embryos (*Piaractus mesopotamicus*) after freezing and thawing. *Zygote* 2012, (FirstView), DOI:10.1017/S096719941200024X
- [43] Shaw JM, Jones GM. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 2003;9:583-605.
- [44] Tsvetkov T, Naydenova Z. Activity of ATP synthetase complex after low temperature treatment or freeze-drying of mitochondria isolated from skeletal muscles. *Cryobiology* 1987;24:280–4.
- [45] Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Goncalves PB, et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod* 2001;64:904-9.
- [46] Sherman JK. Freeze–thaw induced latent injury as a phenomenon in cryobiology. *Cryobiology* 1967;3:407-13.

- [47] Jelley EE. Molecular, nematic and crystal states of 1:1-diethyl- Ψ -cyanine chloride. *Nature* 1939;139:631–32.
- [48] Zampolla T, Zhang T, Holt WV, Rawson DM. Distributional arrangement of mitochondria in the granulosa cells surrounding stage III zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. *Theriogenology* 2009;72:111-19.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os peixes são o grupo de vertebrados que apresentam ameaça de extinção eminente, principalmente devido à sobrepesca e a poluição ambiental. A preocupação e o interesse no desenvolvimento de técnicas que permitam a conservação de gametas e embriões vêm ao encontro de questões atuais tanto no âmbito ecológico quanto de produção de alimentos.

A possibilidade de criar criobancos de espermatozóides, oócitos e embriões que conservem completamente sua viabilidade após recuperação do estado criopreservado, proporcionaria eficiente ferramenta na conservação dos estoques naturais, bem como para a gestão da reprodução na aquicultura.

A manipulação e utilização de sêmen congelado despontam como alternativas viáveis e essenciais para o crescimento e consolidação da indústria aquícola, gestão de programas de melhoramento genético e criação de programas de recuperação ambiental e preservação da diversidade genética das espécies.

Todavia, a criopreservação de espermatozóides preserva apenas o genoma paterno, não sendo suficiente para a preservação completa da diversidade genética, que depende também do genoma de origem materna.

Após inúmeras tentativas frustrantes em criopreservar embriões e oócitos de peixes, fica evidente que o uso da técnica de congelamento lento controlado – foco de todas as pesquisas anteriores – pode não ser o melhor caminho para atingir uma criopreservação bem sucedida.

Essa tese trás uma abordagem diferente, no intuito de abrir caminho para investigação de uma técnica ainda inexplorada, quanto à criopreservação de gametas femininos de peixes. A vitrificação, método de criopreservação livre de gelo, oferece diversas vantagens que podem contribuir para superar algumas das dificuldades encontradas até agora com os protocolos de resfriamento lento. Além disso, a utilização de fragmentos de tecido ovariano contendo os folículos *in situ* é outro ponto que deve ser explorado com maiores detalhes em trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBEEL, E.; ELST, J.; STEIRTEGHEM, A. C. The effect of temperature at which slow cooling is terminated and of thawing rate on the survival of one-cell mouse embryos frozen in dimethyl sulfoxide or 1,2-propanediol solutions. **Cryobiology**, New York, v. 31, n. 5, p. 423-433, 1994.

AHAMMAD, M. M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B. B. Effect of different concentrations of cryoprotectant and extender on the hatching of Indian major carp embryos (*Labeo rohita*, *Catla catla*, and *Cirrhinus mrigala*) stored at low temperature. **Cryobiology**, New York, v. 37, p. 318-324, 1998.

ALMODIN, C. G. et al. Embryo development and gestation using fresh and vitrified oocytes. **Human Reproduction**, Oxford, v. 25, n. 5, p.1192-1198, 2010.

ARAKAVA, T. et al. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis. **Cryobiology**, New York, v. 27, p. 401-415, 1990.

ARAV, A. et al. New trends in gamete's cryopreservation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Limerick, v. 187, p. 77-81, 2002.

ARAV, A. Vitrification of oocytes and embryos. In: LAURIA, A.; GANDOLFI, F. (Ed.). **Trends in embryo transfer**. Cambridge: Portland Press, 1992. p. 255-264.

ARAV, A.; ZERON, Y. Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is affected by the composition and the concentration of the vitrification solution and by the cooling conditions. **Theriogenology**, Stoneham, v. 47, n. 1, p. 341, 1997.

ARMITAGE, W. J. Cryopreservation of animal cells. In: SYMPOSIA OF THE SOCIETY FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, 41., 1987, York. **Temperature and animal cells**. York: SEB, 1987. p. 379-393.

ASHWOOD-SMITH, M. J. Mechanisms of cryoprotective action. In: SYMPOSIA OF THE SOCIETY FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, 41., 1987, York. **Temperature and animal cells**. York: SEB, 1987. p. 395-406.

AXELROD, H. R.; SCHULTZ, L. P. **A handbook of tropical fishes**. New York: Book Co., 1955.

BALLOU J. D. Potential contribution of cryopreserved germplasm to the preservation of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity. **Cryobiology**, New York, v. 29, p. 19-25. 1992.

BASS, L. D. et al. Methanol as cryoprotectant for equine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 16, n. 2, p. 163-164, 2004.

BELOUS, A. M.; GRISCHENKO, V. I. **Cryobiology**. Kyiv: Naukova Dumka Press, 1994.

BIDWELL, C. A. **Reproductive biology in freshwater fish**. Illinois: Purdue University, 1992.

BILLARD, R. et al. Sperm physiology and quality. In: BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. (Ed.). **Broodstock management and egg and larval quality**. Oxford: Blackwell Science, 1995. p. 424.

BILLARD, R.; ZHANG, T. **Technique of genetic resources banking fish**. London: Taylor & Francis, 2001.

BLAXTER J. H. S. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. **Nature**, London, v. 172, p. 1189-1190, 1953.

BOS-MIKICH, A. et al. Fertilization outcome, embryo development and birth after unstimulated IVF. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, New York, v. 28, p. 107-110, 2011.

BUONO R. J.; LINSER, P. J. Transient expression of RSV-CAT in transgenic zebrafish made by electroporation. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, Cambridge, v. 1, p. 271-275, 1992.

CABRITA, E. et al. Effect of different cryoprotectants and vitrification solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). **Cryobiology**, New York, v. 47, p. 204-213, 2003.

CAFFEY R. H.; TIERSCH, T. R. Cost analysis for integration of sperm cryopreservation into an existing fish hatchery. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 31, p. 51-58, 2000.

CAI, X. Y. et al. Cryoloop vitrification of rabbit oocytes. **Human Reproduction**, Oxford, v. 20, p. 1969-1974, 2005.

CANDY, C. J.; WOOD, M. J.; WHITTINGHAM, D. G. Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries. **Human Reproduction**, Oxford, v. 15, n. 6, p. 1300-1304, 2000.

CAROLSFELD, J. et al. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, Liverpool, v. 63, p. 472-489, 2003.

CARROL, J.; WOOD, M. J.; WHITTINGHAM, D. G. Normal fertilization and development of frozen-thawed mouse oocytes: protective action of certain macromolecules. **Biology of Reproduction**, New York, v. 48, p. 606-612, 1993.

CERDÀ, J.; FABRA, M.; RALDÚA, D. Physiological and molecular basis of fish oocyte hydration. In: BABIN, P. J.; CERDÀ, J.; LUBZENS, E. (Ed.). **The fish oocyte**: from basic studies to biotechnological applications. Dordrecht: Springer, 2007. p. 349-396.

CHANG, Y. S. et al. Molecular cloning, structural analysis, and expression of carp ZP3 gene. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 44, p. 295-304, 1996.

CHEN, C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. **Lancet**, London, v. 1, p. 884-886, 1986.

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

CRITSER, J. K. et al. Factors affecting the cryosurvival of mouse two-cell embryos. **Journal of Reproduction and fertility**, Cambridge, v. 82, p. 27-33, 1988.

DARWALL, W. et al. **Freshwater biodiversity - a hidden resource under threat**. Gland, 2008.

DEVRIES, A. L. The role of antifreeze glycopeptides and peptides in the freezing avoidance of Antarctic fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 90B, p. 611-621, 1988.

DEVRIES, A. L.; CHENG, C. H. C. The role of antifreeze glycopeptides and peptides in the survival of cold-water fishes. In: SOMERO, G. N.; OSMOND, C. B.; BOLIS, C. L. (Ed.). **Water and life**. New York: Springer-Verlag, 1992. p. 301-315.

DEVRIES, A. L.; WOHLSCHLAG, D. E. Freezing resistance in some Antarctic fishes. **Science**, Washington, v. 163, p. 1074-1075, 1969.

DINNYÉS, A. et al. Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants: work in progress. **Theriogenology**, Stoneham, v. 50, p. 1-13, 1998.

EDASHIGE, K. et al. Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos are difficult to cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, New York, v. 53, p. 96-106, 2006.

FAHY, G. M. Vitrification: a new approach to organ cryopreservation. **Progress in clinical and biological research**, New York, v. 224, p. 305-335, 1986.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fisheries and Aquaculture Department. **World aquaculture 2010**. Rome, 2011. (Technical Paper, 500/1).

FISHMAN, M. C. et al. Zebrafish: genetic and embryological methods in a transparent vertebrate embryo. **Methods in cell biology**, New York, v. 52, p. 67-82, 1997.

FORNARI, D. C. et al. Increasing storage capability of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos by chilling: development of a useful methodology for hatcheries management. **CryoLetters**, Luton, v. 33, p. 125-133, 2012.

GARCÍA-DÍAZ, M. M. et al. Morphology of the ovotestis of *Serranus atricauda* (Teleostei, Serranidae). **Aquatic Sciences**, Dordrecht, v. 64, p. 87-96, 2002.

GIRAUD, M. N. et al. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. **Human Reproduction**, Oxford, v. 15, p. 2160-2164, 2000.

GORDIENKO, E. A.; PUSHKAR, N. S. **Physical bases of low-temperature preservation of cell suspensions**. Kiev: Naukova Dunka, 1994. 143 p.

GROUT, B.; MORRIS, J.; MCLELLAN, M. Cryopreservation and the maintenance of cell lines. **Trends in biotechnology**, Amsterdam, v. 8, n. 10, p. 293-297, 1990.

GUAN, M.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes by vitrification. **CryoLetters**, Luton, v. 31, p. 230-238, 2010.

GUAN, M.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes using improved controlled slow cooling protocols. **Cryobiology**, New York, v. 56, p. 204-208, 2008.

GWO, J. C. Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review. **Aquaculture Research**, v. 31, p. 259-271, 2000.

HAGEDORN, M. et al. Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos (*Brachidanio rerio*). **Cryobiology**, New York, v. 34, n. 3, p. 251-263, 1997.

HAGEDORN, M. et al. First frozen repository for the Great Barrier Reef coral created. **Cryobiology**, New York, v. 65, n. 2, p. 157-158, 2012.

HAGEDORN, M.; KLEINHANS, F. Problems and prospects in cryopreservation of fish embryos. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. (Ed.). **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000. p. 161-78.

HAMAZAKI, T. S. et al. A glycoprotein from the liver constitutes the inner layer of the egg envelope (zona pellucida interna) of the fish, *Oryzias latipes*. **Developmental Biology**, Orlando, v. 133, p. 101-110, 1989.

HAMAZAKI, T.; IUCHI, I.; YAMAGAMI, K. A spawning female-specific substance reactive to anti-chorion (egg-envelope) glycoprotein antibody in the teleost, *Oryzias latipes*. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 235, p. 269-279, 1985.

HARGENS, A. R. Freezing resistance in polar fishes. **Science**, Washington, v. 176, n. 4031, p. 184-186, 1972.

HARTLING, R. C.; KUNKEL, J. G. Developmental fate of the yolk protein lipovitellin in embryos and larvae of winter flounder (*Pleuronectes americanus*). **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 284, p. 686-695, 1999.

HARVEY, B. Cooling of embryonic cells, isolated blastoderms, and intact embryos of the zebrafish *Brachydanio rerio* to -196 °C. **Cryobiology**, New York, v. 20, p. 440-447, 1983.

HERMAN, H. A.; MITCHELL, J. R.; DOAK, G. A. **The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle**. 4th ed. Danville: Interstate Publishers, 1994. 382 p.

HUANG, L. et al. Cryopreservation of human ovarian tissue by solid-surface vitrification. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 139, n. 2, p. 193-198, 2008.

ISACHENKO, E. F.; NAYUDU, P. L. Vitrification of mouse germinal vesicle oocytes: effect of treatment temperature and egg yolk on chromatin and spindle normality. **Human Reproduction**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 400-408, 1999.

ISAYEVA, A.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. **Cryobiology**, New York, v. 49, p. 114-122, 2004.

IUCN - International Union for Conservation of Nature. **The IUCN red list of threatened species**. 2003. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 04 jul. 2012.

JANIK, M.; KLEINHANS, F. W.; HAGEDORN, M. Overcoming a permeability barrier by microinjecting cryoprotectants into zebrafish embryos (*Brachydanio rerio*). **Cryobiology**, New York, v. 41, n. 1, p. 25-34, 2000.

JIN, Y. **Freezing avoidance of Antarctic fishes**: the role of a novel antifreeze potentiating protein and the antifreeze glycoproteins. 2003. 202 f. Thesis (Ph.D.) - University of Illinois at Urbana-Champaign, Champaign, 2003.

KIM, T. J.; HONG, S. W. Successful live birth from vitrified oocytes after 5 years of cryopreservation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, New York, v. 28, p. 73-76, 2011.

KLYACHKO, O. S.; POLOSUKHINA, E. S.; OZERNYUK, N. D. The effects of temperature and chorionic gonadotropin on the functional properties of lactate dehydrogenase from oocytes of loach *Misgurnus fossilis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 111B, p. 517-521, 1995.

KOPEIKA, J.; RAWSON, D.; ZHANG, T. Preliminary study on modification of yolk sac of zebrafish embryos (*Danio rerio*) using microinjection. **CryoLetters**, Luton, v. 27, n. 5, p. 319-328, 2006.

KUWAYAMA, M. et al. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reproductive Biomedicine Online**, Cambridge v. 11, p. 300-308, 2005.

LASSALE, B.; TESTART, J.; RENARD, J. P. Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propanediol. **Fertility and sterility**, New York, v. 44 n. 5, p. 645-651, 1985.

LATTMAN, E. E.; FIEBIG, K. M.; DILL, K. A. Modeling compact denatured states of proteins. **Biochemistry**, Washington, v. 33, n. 20, p. 6158-6166, 1994.

LE MENN F.; CERDA, J.; BABIN, P. J. Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicle. In: BABIN, P. J.; CERDA, J.; LUBZENS, E. (Ed.). **The fish oocyte**: from basic studies to biotechnological applications. Dordrecht: Springer, 2007. p. 1-8.

LEFF, D. Zebrafish: a virus with a backbone. **Mosaic**, v. 23, p. 25-35, 1992.

LEUNG, L. K. P.; JAMIESON, B. G. M. Live preservation of gametes. In: Jamieson, B. G. M. (Ed.). **Fish evolution and systematics**: evidence from spermatozoa. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p. 245-263.

LINHART, O. et al. Cryopreservation of European catfish *Silurus glanis* sperm: sperm motility, viability, and hatching success of embryos. **Cryobiology**, New York, v. 51, p. 250-261, 2005.

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**, Stoneham, v. 55, n. 8, p. 1719-1731, 2001.

LIU, X. H.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. The effect of partial of yolk on the chilling sensivity of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Cryobiology**, New York, v. 39, p. 236-242, 1999.

LOPES, T. S. et al. Chilling curves for *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) embryos stored at -8°C . **Zygote**, Cambridge, 2012. FirstView. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/S0967199412000020>>. Acesso em: 10 mar. 2012.

LUBZENS, E. et al. Cryopreservation of oocytes from a marine fish: achievements and obstacles. **Cryobiology**, New York, v. 51, p. 385, 2005.

LUBZENS, E. et al. Evaluating viability of fish oocytes: a first step towards methods for cryopreservation. **Cryobiology**, New York, v. 47, p. 268, 2003.

LUBZENS, E. et al. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 165, p. 367-389, 2010.

LUBZENS, E.; PEKARSKY, I.; BLAIS, I. Developing methods for cryopreservation of fish oocytes: accumulation of [^{14}C] methods in zebrafish and gilthead seabream oocytes. **Cryobiology**, New York, v. 49, p. 319, 2004.

LUYET, B. J. The vitrification of organic colloids and of protoplasm. **Biodynamica**, Normandy, v. 1, p. 1-14, 1937.

LUYET, B. J.; GEHENIO, P. M. **Life and death at low temperatures**. Normandy: **Biodynamica**, 1940. 356 p.

LYONS, C. E. et al. Expression and structural analysis of a teleost homolog of a mammalian zona pellucida gene. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 268, p. 21351-21358, 1993.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S. et al. Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. **Theriogenology**, Stoneham, v. 71, p. 594-604, 2009.

MAZUR, P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. **Journal of General Physiology**, New York, v. 47, p. 347-369, 1963.

MAZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. **Science**, Washington, v. 168, n. 934, p. 939-949, 1970.

MAZUR, P. *Equilibrium, quasi-equilibrium and nonequilibrium* freezing of mammalian embryos. **Cell Biophysics**, London, v. 17, p. 53-91, 1990.

MAZUR, P. et al. Interactions of cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cells. In: WOLSTENHOLME, G. E. W.; O'CONNOR, M.; CHURCHILL, A. (Ed.). **The frozen cell**. London: A Ciba Foundation, 1970.

MAZUR, P. Principles of cryopreservation. In: FULLER, B.; LANE, N.; BENSON, E. (Ed.). **Life in the frozen state**. London: CRC Press, 2004. p. 3-66.

MAZUR, P.; RALL, W. F.; LEIBO, S. P. Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova. Influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability. **Cell Biophysics**, London, v. 6, n. 3, p.197-213, 1984.

MCKERSIE, B. D.; HOEKSTRA, F. A.; KRIEG, L. C. Differences in the susceptibility of plant membrane lipids to peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1030, n. 1, p. 119-126, 1990.

MULDREW, K.; MCGANN, L. E. **Cryobiology - a short course**. Calgary: University of Calgary, University of Alberta, 1999. Disponível em: <http://people.ucalgary.ca/~kmuldrew/cryo_course/course_outline.html>. Acesso em: 20 jun. 2012.

MYLONAS, C. C.; FOSTIER, A.; ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 165, p. 516-534, 2010.

NAGAHAMA, Y. et al. Relative *in vitro* effectiveness of 17 alpha, 20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one and other pregnene derivatives on germinal vesicle breakdown in oocytes of ayu (*Plecoglossus altivelis*), amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*), rainbow trout (*Salmo gairdneri*), and goldfish (*Carassius auratus*). **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 51, n. 1, p. 15-23, 1983.

NEVES, P. R. et al. Injuries in pacu embryos (*Piaractus mesopotamicus*) after freezing and thawing. **Zygote**, Cambridge, 2012. FirstView. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/S096719941200024X>>. Acesso em: 12 jul. 2012.

NEWTON, H. et al. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. **Human Reproduction**, Oxford, v. 11, n. 7, p. 1487-1491, 1996.

NINHAUS-SILVEIRA, A. et al. Cryogenic preservation of embryos of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote**, Cambridge, v. 17, p. 45-55, 2008.

PEGG, D. E. Red cell volume in glycerol/sodium chloride/water mixtures. **Cryobiology**, New York, v. 2, p. 234-239, 1984.

PICTON, H. M.; GOSDEN, R. G.; LEIBO, S. P. Cryopreservation of oocytes and ovarian tissue. Gamete source, manipulation and disposition (review). In: VAYENA, E.; ROWE, P.; GRIFFIN, P. D. (Ed.). **Current practices and controversies in assisted reproduction**. Geneva: World Health Organization, 2002. p. 142-151.

PLACHINTA, M.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Preliminary studies on cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) vitellogenic oocytes using controlled slow cooling. **Cryobiology**, New York, v. 49, p. 347, 2004.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, London, v. 164, p. 666, 1949.

PRASAD, T. K. Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. **The Plant Journal**, Oxford, v. 10, p. 1017-1026, 1996.

RALL, W. F. Recent advances in the cryopreservation of salmonid fishes. In: CLOUD, J. G.; THORGAARD, G. H. (Ed.). **Genetic conservation of salmonid fishes**. New York: Plenum, 1993. p. 137-58.

RALL, W. F.; FAHY, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification. **Nature**, London, v. 24, p. 387-402, 1985.

RAUEN, U. et al. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 13, p. 155-168, 1999.

RAWSON, D. M.; MCGREGOR REID, G.; LLOYD, R. E. Conservation rationale, research applications and techniques in the cryopreservation of lower vertebrate biodiversity from marine and freshwater environments. **International Zoo Yearbook**, London, v. 45, p. 1-16, 2011.

RAYMOND J. A.; DEVRIES, A. L. Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, p. 2589 -2593, 1977.

REID, G. McG.; HALL, H. Reproduction in fishes in relation to conservation. In: HOLT, W.; et al. (Ed.). **Reproductive science and integrated conservation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2003. p. 375-93.

RIGGIO, M. et al. Changes in zinc, copper and metallothionein contents during oocyte growth and early development of the teleost *Danio rerio* (zebrafish). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, New York, v. 135, p. 191-196, 2003.

ROBINSON, M. P. et al. Electromagnetic re-warming of cryopreserved tissues: effect of choice of cryoprotectant and sample shape on uniformity of heating. **Physics in medicine and biology**, London, v. 47, p. 2311-2325, 2002.

ROBLES, V. et al. Micro injection of the antifreeze protein type III (AFPIII) in turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos: toxicity and protein distribution. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 261, p. 1299- 1306, 2006.

ROBLES, V. et al. Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species. **Theriogenology**, Stoneham, v. 64, p. 1633-1646, 2005.

ROUTRAY, P. et al. Factors affecting the uptake of DMSO by the eggs and embryos of medaka (*Oryzias latipes*). **Theriogenology**, Stoneham, v. 58, n. 8, p. 1483-1496, 2002.

SALLE, B. et al. Restoration of ovarian steroid secretion and histological assessment after freezing, thawing, and autograft of a hemi-ovary in sheep. **Fertility and Sterility**, New York, v. 72, p. 366-370, 1999.

SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, Cambridge, v. 141, p. 1-19, 2011.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 101, n. 1, p. 7-12, 1993.

SEKI, S. et al. Development of a reliable *in vitro* maturation system for zebrafish oocytes. **Reproduction**, Cambridge, v. 135, p. 285-292, 2008.

SELMAN, K. et al. Stage of oocyte development in the Zebrafish, *Brachydanio rerio*. **Journal of Morphology**, Philadelphia, v. 218, p. 203-224, 1993.

SITTIG, M. **Cryogenics**: research and applications. New York: D. Van Nostrand Company, 1963.

SQUIRE, J. M.; KNUPP, C.; LUTHER, P. K. Zebrafish - topical, transparent, and tractable for ultrastructural studies. **Journal of General Physiology**, New York, v. 131, n. 5, p. 439-443, 2008.

STACHECKI, J. J.; COHEN, J.; WILLADSEN, S. M. Cryopreservation of unfertilized mouse oocytes: the effect of replacing sodium with choline in the freezing medium. **Cryobiology**, New York, v. 37, p. 346-354, 1998.

STACHECKI, J. J.; WILLADSEN, S. M. Cryopreservation of mouse oocytes using medium with slow sodium content: effect of plunge temperature. **Cryobiology**, New York, v. 40, p. 4-12, 2000.

STAINIER, D. Y.; FISHMAN, M. C. Patterning the zebrafish heart tube: acquisition of anteroposterior polarity. **Developmental Biology**, Orlando, v. 153, n. 1, p. 91-101, 1992.

STEWART, D. L. Storage of bull spermatozoa at low temperatures. **Veterinary Record**, London, v. 63, p. 65-66, 1951.

STREHLOW, D.; HEINRICH, G.; GILBERT, W. The fates of the blastomeres of the 16 cell zebrafish embryo. **Development**, Cambridge, v. 120, n. 7, p. 1791-1798, 1994.

STREIT Jr, D. P. et al. Qualitative parameters of the piapara semen (*Leporinus elongatus* Valenciennes, 1850). **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, v. 68, p. 373-377, 2008a.

STREIT JR., D. P. et al. Parâmetros qualitativos do sêmen de dourado (*Salminus maxillosus*) em cativeiro. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 34, p. 337-344, 2008b.

SUWA, K.; YAMASHITA, M. Regulatory mechanisms of oocyte maturation and ovulation. In: BABIN, P. J.; CERDÀ, J.; LUBZENS, E. (Ed.). **The fish oocyte: from basic studies to biotechnological applications**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 323-347.

TAJIMA, K.; SHIMIZU, N. Effect of sterol, alcohol and dimethyl sulfoxide on sorghum seedling damaged by above-freezing low temperature. **Proceedings of the Crop Science Society of Japan**, Tokyo, v. 42, n. 2, p. 220-226, 1973.

THIRUMALA, S. et al. Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. **Theriogenology**, Stoneham, v. 66, p. 964-973, 2006.

TIERSCH, T. R. **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000.

TIERSCH, T. R. et al. Sperm cryopreservation in fish and shellfish. **Society of Reproduction and Fertility Supplement**, Nottingham, v. 65, p. 493-508, 2007.

TORNER, M. et al. Nonequilibrium freezing of one-cell mouse embryos: membrane integrity and developmental potential. **Biophysical Journal**, New York, v. 64, n. 6, p. 1908-1921, 1993.

TSAI, S.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Development of cryopreservation protocols for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles using controlled slow cooling. **Theriogenology**, Stoneham, v. 71, p. 1226–1233, 2009a.

TSAI, S.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Studies on chilling sensitivity of early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. **Cryobiology**, New York, v. 58, p. 279-286, 2009b.

TSANG, E. W. et al. Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. **Plant Cell**, Rockville, v. 3, n. 8, p. 783-792, 1991.

TSVETKOVA, L. I. et al. Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeons *Acipenser baeri* and *A. ruthenus*. **Journal of Applied Ichthyology**, Hamburg, v. 12, p. 107-112, 1996.

VAJTA, G. et al. Open pulled straw (OPS) vitrification of cattle oocytes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 49, p. 176, 1998.

VAJTA, G.; NAGY, Z. P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive Biomedicine Online**, Cambridge, v.12, p.779-796, 2006.

VALDEZ, M. D. et al. Sensitivity to chilling of medaka (*Oryzias latipes*) embryos at various developmental stages. **Theriogenology**, Stoneham, v. 64, p. 112-122, 2005.

VAZZOLER, A. E. A. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos**: teoria e prática. Maringá: EDUEM, 1996. 169 p.

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 35, p. 137-150, 2009.

WALLACE, R. A.; SELMAN, K. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in Teleosts. **American Zoologist**, Thousand Oaks, v. 21, p. 325-343, 1981.

WENG, C. F. et al. Antagonizing effects of type I antifreeze protein on Ca⁺⁺ uptake in fish TO-2 cells. **Zoological Studies**, Taipei, v. 39, n. 2, p. 144-150, 2000.

WESSEL, G. M.; BALL, B. A. Step-wise dilution for removal of glycerol from fresh and cryopreserved equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 84, p. 147-156, 2004.

WESTERFIELD, M. **The zebrafish book**. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). Eugene: University of Oregon Press, 2000.

WHITTINGHAM, D. G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. **Nature**, London, v. 233, p. 125-126, 1971.

WHITTINGHAM, D. G.; LEIBO, S. P.; MAZUR, P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . **Science**, Washington, v. 178, p. 411-414, 1972.

WILLADSEN, S. M. et al. Deep freezing of sheep embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 46, p. 151-154, 1976.

WILLADSEN, S.; POLGE, C.; ROWSON, L. E. A. The viability of deep-frozen cow embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 52, p. 391-393, 1978.

WILMUT, I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development of survival of mouse embryos during freezing and thawing. **Life Sciences**, Oxford, v. 11, p. 1071-1079, 1972.

WILMUT, I.; ROWSON, L. E. Experiments on the low - temperature preservation of cow embryos. **Veterinary Record**, London, v. 92, p. 686-690, 1973.

WOOD, K. A.; YOULE, R. J. The role of free radicals and p53 in neuron apoptosis in vivo. **Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 15, n. 8, p. 5851-5857, 1995.

WOODS, E. et al. Equations for obtaining melting points for the ternary system ethylene glycol/sodium chloride/water and their application to cryopreservation. **Cryobiology**, New York, v. 38, p. 403-407. 1999.

YAVIN, S.; ARAV, A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. **Theriogenology**, Stoneham, v. 67, p. 81-89, 2007.

YI, G.; KEJUN, G.; XIAOGUANG, T. Oocyte retrieval and *in vitro* maturation from frozen thawed human ovarian cortex transplanted in immune suppressed mice. **Chinese Medical Journal**, Peking, v. 14, n. 11, p. 85-91, 2001.

ZHANG, J. et al. Improved development of ovine matured oocyte following solid surface vitrification (SSV): effect of cumulus cells and cytoskeleton stabilizer. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 110, p. 46-55, 2008.

ZHANG, T. et al. Low-temperature preservation of fish gonad cells and oocytes. In: BABIN, P. J.; CERDÀ, J.; LUBZENS, E. (Ed.). **The fish oocyte: from basic studies to biotechnological applications**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 411-436.

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

ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Permeability of dechorionated one-cell and six-somite stage zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos to water and methanol. **Cryobiology**, New York, v. 37, p. 13-21, 1998.

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

ZHANG, T.; RAWSON, D. M.; MORRIS, G. J. Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*). **Aquatic Living Resources**, v. 6, p. 145-153, 1993.

ZHANG, X. S. et al. A study on the cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) embryos, **CryoLetters**, Luton, v. 10, p. 271-278, 1989.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Relação dos químicos utilizados nos experimentos.

Nome do produto	Fornecedor	N° de referência
Ácido perclórico	Sigma-Aldrich	244252
Água esterelizada	Sigma	W4502
DMSO	Sigma-Aldrich	472301
EDTA	Sigma	E5134
Etanol	Sigma	E/0600DF/17
Etileno glicol	Sigma	E9129
Glicose	Sigma	G5767
Hidróxido de potássio	Sigma-Aldrich	P4494
Hidróxido de sódio	Sigma-Aldrich	S-26-37/39-45
Kit ATP	Sigma	FL-AA
Leibovitz (L-15)	Sigma	L4386
Metanol	Sigma-Aldrich	154903
Propileno glicol	BDH	296736W
Sacarose	Sigma	S5016
Sonda fluorescente JC-1	Sigma	CS0390
Tricaína	Sigma	A5040
Trypan Blue	Sigma	T8154

APÊNDICE 2



WORLD AQUACULTURE 2011

Natal, Brazil • June 6-10

**WORLD
AQUACULTURE
Society**



ABOCC
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÕES



Certificate of Participation

Leandro Godoy

**Danilo Streit Jr., Adriana Bos-Mikich, Nívia Lothhammer Lothhammer, Luis
Ricardo Jayme Guerreiro Guerreiro**

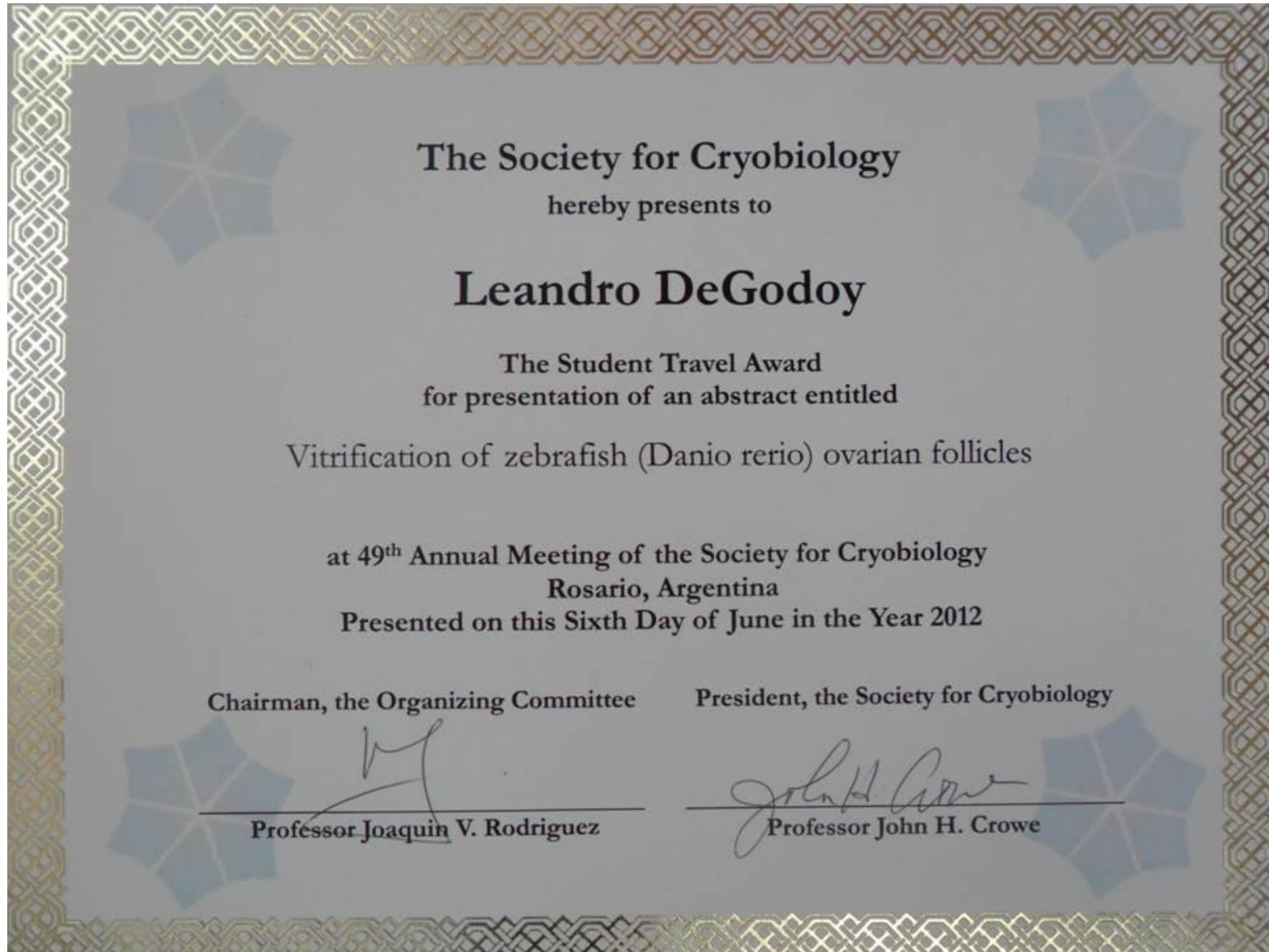
for Oral Presentation of

**CRYOPRESERVATION OF FISH FEMALE GAMETES: RECENT ADVANCES AND
CHALLENGES**


Itamar Rocha
Co-Chair


Michael Schwarz
Co-Chair

APÉNDICE 3



APÊNDICE 4 - Guia para autores

THERIOGENOLOGY - GUIDE FOR AUTHORS



INTRODUCTION

Please consult this Guide for Authors for further details on the requirements for submitting your paper to *Theriogenology*. The guidelines described in this document should be adhered to carefully, to ensure high-quality and rapid publication of your manuscript.

Theriogenology is an international, peer-reviewed journal that publishes papers regarding the study of reproduction in domestic and non-domestic mammals, birds, reptiles, and fish. *Theriogenology* publishes only material that has never been previously published and is not currently being considered for publication elsewhere; the exception would be limited disclosure (e.g. publication of an abstract or in the proceedings of a scientific conference, with limited circulation).

Types of article

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Technical Notes

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects within the scope of the journal that are of active current interest. They are usually invited, but prospective Authors may contact the Editors with proposals.

Technical Notes are concise, comprehensive descriptions of technical aspects of innovative methods (that will not be subsequently published as a full-length paper). The entire submitted manuscript typically should not exceed approximately 12 double-spaced pages.

Page Charges

This journal has no page charges.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>

Policy and Ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki)* for experiments involving humans

☞ <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; *EU Directive 2010/63/EU for animal experiments*

☞ http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*

☞ <http://www.icmje.org>.

This must be stated at an appropriate point in the article. Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of Theriogenology.

Conflict of Interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>

Submission Declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under current consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition, analysis and interpretation of data; (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to Authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript, together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles (including abstracts) for internal circulation within their institutions. However, permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>).

Retained Author Rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details see <http://www.elsevier.com/authorsrights>.]

Role of the Funding Source

You are requested to identify the source(s) of financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and

interpretation of data; in writing the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement, this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding Body Agreements and Policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors, whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies, please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online; you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail, removing the need for a paper trail. **Submit your article** Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/therio>.

Referees

Please submit, as part of the covering letter with the manuscript, the names, full affiliations (department, institution, city and country) and e-mail addresses of 3

potential Referees. Appropriate Referees should be knowledgeable about the subject, but have no close connection with any of the authors. You may also suggest reviewers you do not want to review your manuscript, but please state your reasons for doing so.

PREPARATION

Use of word-processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format and double spaced. It is important that all pages and lines are numbered. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts, etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the word processor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. In lieu of a grid, use tabs, not spaces, to align columns. Electronic text should be prepared similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file; instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your word processor, and to read it critically.

Article Structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1. (then 1.1.1., 1.1.2., ...), 1.2., etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line, with one blank line above and below.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. Introduction should generally not exceed 2 manuscript pages (double-spaced).

Materials and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published in a readily available source should be indicated by a reference (only relevant modifications should be described).

Results

Results should be clear and concise. If data are reported in a table or figure, the text should only highlight the information, but not repeat it in detail.

Discussion

This should explore the relevance and implications of the results of the work, not simply repeat them. A combined Results and Discussion section may be appropriate. Avoid excessive citations and discussion of published literature. Although there are always exceptions, in general the Discussion section should generally not exceed 40% of the manuscript (excluding references, figures, and tables) and there should be no more than 35 references (except for review papers).

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or a Results and Discussion section.

Essential title page information

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations, trade names, and formulae.

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. First names or initials can be used according to author preference. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

Corresponding author. Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of review and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Since an abstract is often presented separately from the article, it must be able to stand alone. For this reason, references should generally be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if their use is essential, they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Abstracts must be limited to a single paragraph with no more than 2,500 keystrokes (characters plus spaces).

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Some keywords may be identical to words used in the title, but consideration should be given to keywords which are complimentary to words used in the title (to facilitate retrieval of your article from electronic databases). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field should be used. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references; therefore, do not include them on the title page, as a footnote to the title, etc.. List individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.), sources of financial support, and donations of products and materials.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text). Please see *Additional Style Notes* below.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Image manipulation

Although it is generally accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork. Avoid excessively large fonts.
 - For labels on figures, both those on the figure axes as well as those directly on the figure, capitalize only the first letter of the first word.
 - Do not prepare a figure to communicate very limited data that could easily be included in the text of the Results.
 - Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
 - Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
 - Number the illustrations according to their sequence in the text.
 - Use a logical naming convention for your artwork files.
 - Provide captions to illustrations separately.
 - Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures, then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites), regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **Information regarding the cost of color reproduction in print will be sent by Elsevier after your article has been accepted.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Since technical complications can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version, should you not opt for color in print), if you have any figures with color that will not be published in color in the printed version, please submit two versions (color and usable black and white).

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Present incidental graphics not suitable for mention as figures, plates or schemes at the end of the article and number them "Graphic 1", etc. Their precise position in the text can then be indicated. See further information under Electronic artwork. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left, but such embedding should not be done specifically for publishing purposes. Further, high-resolution graphics files must be provided separately. **Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References**Citation in text**

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be

given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: "...as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result..."

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they first appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

- [1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51-9.

Reference to a book:

- [2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

- [3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281-304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than 6 authors, the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details, you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927-34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: ☞ <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of serial title word abbreviations: ☞ <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): ☞ <http://www.cas.org/sent.html>.

Do not abbreviate a journal name which is a single word, or is in a language other than English.

Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer authors additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips, etc. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: ☞ <http://www.sciencedirect.com>. To ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. Video files: please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your supplementary information. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Additional style notes

Please use the following words, phrases, abbreviations, and stylistic conventions

- Avoid the word "injected," (e.g., "Cows were injected with cloprostenol") but include the generic name, proprietary name, dosage and route of administration (e.g., "Cows were treated with cloprostenol [Estrumate 500 Mg im]").
- Either cite a P value (recommended for Abstract and for Results) or use the term 'significant' (recommended for Discussion), but generally avoid doing both.
- Terms with a specific statistical meaning (i.e. significant, tended and correlated), should only be used in a strict statistical context.
- Numbers less than 10 are written as a word, unless followed by an abbreviation for unit of measure, e.g. five embryos, 5 min

Use the following expressions

- transrectal palpation, not rectal palpation
- nucleus transfer, not nuclear transplant
- estrus (noun) synchronization, but, estrous (adjective) behavior
- sperm can be used as both noun and adjective
- 120 to 125, not 120-125
- treatment by period, not treatment X period
- gravity: 100 X g (in lieu of speed for centrifugation)

- magnification: X 100
- identification number of an animal: No. 10, but 30 animals: n = 30
- 3 d, Day 3 (define Day 0)

Standard definitions

- oogonium: female gamete before meiosis
- oocyte, primary: female gamete from onset of the first maturation division (meiosis) to extrusion of the first polar body
- oocyte secondary: female gamete from onset of second meiosis to extrusion of the second polar body
- ovum: female gamete from the end of both meiotic divisions until the union of the male and female pronuclei (differs from the common use of ovum as a general term for any female gamete)
- germinal vesicle: nucleus of the ovum
- zygote: a fertilized ovum, from fusion of the male and female gamete to completion of first cleavage
- embryo: a conceptus from the 2-cell stage to the stage when cell migration and differentiation are largely complete
- fetus: a conceptus after organogenesis is mostly complete (primarily increasing in size)
- conceptus: an embryo or fetus with all its membranes and accessory structures
- abortion: expulsion of a conceptus incapable of independent life
- premature parturition: expulsion (before full term) of a conceptus capable of independent life
- stillbirth: avoid this term (use fetal death or abortion)

Abbreviations

Never use an abbreviation to start a sentence. Some abbreviations may be used anywhere else, including the manuscript's title and in figures, table titles and legends, without definition; others may not be used in the title, but may be used in the text without definition. In general, abbreviations must be defined when used for the first time (this may be avoided in the ABSTRACT if necessary to conserve space). To make reading the paper more pleasant, avoid using excessive abbreviations and acronyms; instead use short synonyms, for instance: for "Cesarean section" instead of "CS" use "section" or "hysterotomy." The following abbreviations may be used in the text without definition (note that abbreviations exclude periods):

AI	ANOVA	ADP	ATP	BSA
cAMP	CL	DEAE-cellulose	DMSO	DNA
eCG	EDTA	EGF	ELISA	FSH
GH	GnRH	hCG	HEPE	ShMG
IVC	IVF	IVM	LH	MOET
MSH	mRNA	NAD	NADH	PBS
PGF _{2α}	PGFM	PIPES	PRID	PRL
RIA	RNA	SDS-PAGE	SCNT	TRH
TRIS	tRNA	TSH		

Units of Measure

cpm - counts per min
 dpm - disintegrations per min
 g - gram
 ga - gauge of hypodermic needle
 h - hour
 kg - kilogram
 L - liter
 mL - milliliter
 μL - microliter
 m - meter
 min - minute
 mo - month
 s - second
 v:v - volume ratio
 wk - week
 wt/vol - weight per volume
 y - year

Routes of treatment

id - intradermal
 im - intramuscular
 iu - intrauterine
 iv - intravenous
 sc - subcutaneous
 po - oral

Statistical expressions

ANOVA - analysis of variance
 CV - coefficient of variation
 df - degrees of freedom
 F - variance ratio
 NS - not significant
 P - probability
 SD - standard deviation
 SEM - standard error of the mean
 r - correlation coefficient
 r² - coefficient of regression

Additional information

- For issues of style and format not addressed here, please consult *Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers*, Sixth Edition.
- For spelling, word formation and divisions, plurals, possessives, meanings and usage, consult the CBE Manual or a current English language (collegiate-level or higher) dictionary.
- For conflicts between instructions in this Guide and any of the references, the Guide takes precedence. Do not hesitate to contact the Editorial Office if you have any questions regarding preparation of your manuscript.

Submission Checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details regarding any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked' (and critically read and reviewed)
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information, please visit our customer support site at

☞ <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE**Use of the Digital Object Identifier**

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information.

The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*): doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071
When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address, then paper proofs will be sent by post), or a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are on the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and send by e-mail or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that if no response is received, Elsevier may proceed with publication of your article.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

Updated January 2012



VITA

Leandro Cesar de Godoy, filho de Mario Cesar de Godoy e Inez de Jesus Pereira de Godoy, nasceu no dia 19 de abril de 1982, no município de Tapejara, Estado do Paraná.

Iniciou o ensino fundamental na extinta Escola Rural Municipal Nereu Ramos, e concluiu o ensino médio no ano de 1999 no Colégio Santana de Tapejara.

No ano de 2002 ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá (UEM - PR), iniciando como estagiário na Estação de Piscicultura UEM/CODAPAR, onde nasceu a paixão pela área de aquicultura, a qual norteou seu envolvimento com a pesquisa como aluno de iniciação científica ao longo de todo o curso de graduação. No ano de 2006 conclui o curso de Zootecnia, defendendo como monografia o desenvolvimento de uma farinha aromatizada a partir de carcaças de peixes para aplicação na merenda escolar, o que o levou, dois anos mais tarde, a conquistar o Prêmio Henri Nestlé de Nutrição & Saúde (1º edição) na categoria Tecnologia e Bioquímica de Alimentos.

Ainda no ano de 2006 é aprovado no processo seletivo do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande (FURG - RS), iniciando o curso de mestrado, o qual finalizou em 2008.

Em 2009 iniciou o curso de Doutorado em Zootecnia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS - RS) sob a orientação do Prof. Danilo P. Streit Jr, onde passa a desenvolver pesquisas envolvendo biotecnologias na reprodução de peixes, em especial na área de criobiologia. Em 2010 é estabelecido o primeiro contato com a renomada pesquisadora britânica na área de criopreservação de gametas/embriões de peixes, Dr^a Tiantian Zhang, levando ao estabelecimento de uma parceria internacional em pesquisa. No ano seguinte é contemplado com uma bolsa de doutorado sanduiche no exterior (CAPES - PDSE), permanecendo pelo período de um ano junto ao LIRANS Institute of Research in the Applied Natural Sciences na University of Bedfordshire (Inglaterra), onde desenvolveu toda a parte experimental do projeto de tese.

Em agosto de 2012 retorna ao Brasil para submeter-se à avaliação de defesa da Tese de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração Produção Animal (UFRGS).