

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

RÔMULO BATISTA RODRIGUES

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE ZEBRAFISH

Porto Alegre

2020

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

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE ZEBRAFISH

RÔMULO BATISTA RODRIGUES

Zootecnista/UFSM

Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca/UNIOESTE

Tese apresentada como requisito para obtenção do Grau de Doutor em Zootecnia
Área de concentração: Produção Animal

Porto Alegre (RS), Brasil

Março de 2020

CIP - Catalogação na Publicação

Rodrigues, Rômulo Batista
CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMEN DE ZEBRAFISH / Rômulo
Batista Rodrigues. -- 2020.
192 f.
Orientador: Danilo Pedro Streit Júnior.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Aquicultura. 2. Bancos de germoplasma. 3.
Criobiologia. 4. Criopreservação seminal. 5.
Zebrafish. I. Streit Júnior, Danilo Pedro, orient.
II. Título.

Rômulo Batista Rodrigues
Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca

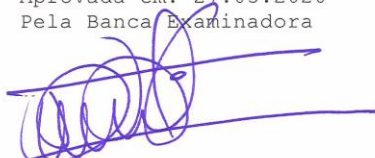
TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOUTOR EM ZOOTECNIA

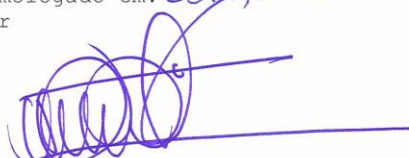
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 27.03.2020
Pela Banca Examinadora



DANILO PEDRO STREIT JR.
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientador

Homologado em: 20/05/2020
Por



DANILO PEDRO STREIT JR.
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia


Patrícia Alexandra Cavalcanti Diogo
Patrícia Diogo
Necton S.A



Victor Gallego
Universitat Politècnica de València



Diogo Losch de Oliveira
UFRGS



CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de Agronomia

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, em especial a minha mãe Beatriz e minha irmã Renata, e meu pai Aliomar, por todo amor, suporte e apoio que me incentivam a buscar todos os meus objetivos.

À minha namorada Mariana, agradeço por todo o companheirismo e amor, ao longo de todo o período de doutorado, além disso, seu auxílio na execução de análises, estudos e escrita foram essenciais para elaboração dessa tese.

Ao Prof. Danilo Pedro Streit Jr., meu orientador de doutorado, obrigado pelo apoio, orientação e amizade. Agradeço por ter aberto as portas do AQUAM e de uma área de pesquisa completamente nova para mim. Obrigado pela confiança para execução não apenas desse trabalho, como também de diversos projetos paralelos que me desafiaram e me fizeram crescer profissionalmente.

Aos colegas do AQUAM, agradeço pela ajuda nas pesquisas e pela parceria. Agradeço em especial a Lis Marques e Andrea Galuppo pelas trocas de ideias e orientações, além de servirem como exemplo de profissionais para mim. Agradeço aos estagiários e ICs do laboratório por todo suporte que permitem a execução dos projetos no laboratório. A colaboração e troca de conhecimento com todos colegas do laboratório foi uma das coisas mais satisfatórias do período de doutorado.

Ao Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, pela realização das análises bioquímicas, em especial para a Profa. Dinara Moura e a Profa. Verônica Brito.

Ao Laboratório de Bioquímica da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), pelo suporte para realização das análises de DNA e fluorescência, em especial para Profa. Carla Vogel, Mariana Uczay e Mariana Canever.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite para colaborar com este trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro durante o período de doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pela oportunidade de realizar meu doutorado.

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE ZEBRAFISH¹

Autor: Rômulo Batista Rodrigues
Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

Resumo: O zebrafish apresenta diversas características interessantes, que fazem da espécie um modelo biológico popular para estudos de diversas áreas de pesquisa, resultando em um elevado desenvolvimento de novas linhagens que precisam ser mantidas e preservadas. A criopreservação pode atender essa necessidade de manter os recursos genéticos da espécie, o que torna o desenvolvimento de pesquisas na área de suma importância. Esta tese tem como objetivo principal realizar um levantamento do histórico da pesquisa sobre criopreservação em zebrafish e realizar o desenvolvimento de protocolos de criopreservação de sêmen de zebrafish utilizando diversos tipos de avaliações sobre os danos causados pelo processo de criopreservação. O objetivo do primeiro estudo foi realizar uma revisão sistemática sobre a criopreservação de tecidos e células reprodutivas de zebrafish. Na revisão sistemática foi possível identificar e quantificar as principais características dos protocolos de criopreservação já utilizados em diferentes tipos de amostras. Com os resultados obtidos nesse estudo foi possível identificar limitações e tendências para novas pesquisas, além de confirmar que assim como em outras espécies de peixes, a criopreservação de sêmen é o método mais efetivo para preservação do material genético do zebrafish. No segundo estudo objetivou-se avaliar a combinação e interação de diferentes extensores, crioprotetores permeáveis e não permeáveis, analisando os efeitos da criopreservação sobre os espermatozoides através de uma abordagem ampla de variáveis. Nesse estudo foi possível identificar que a utilização do leite em pó na solução crioprotetora promoveu maior proteção aos espermatozoides, especialmente quanto aos danos oxidativos e de DNA. No terceiro estudo o objetivo foi avaliar o estresse oxidativo e os danos no DNA em diferentes etapas do processo de criopreservação. Observou-se que a etapa de congelamento/descongelamento gerou mais danos que a exposição do sêmen aos crioprotetores durante o equilíbrio. Foi possível identificar que a utilização de leite em pó diminuiu a geração de espécies reativas de oxigênio e a fragmentação de DNA, além de promover maior atividade antioxidante. Com todos os resultados obtidos foi possível observar que a criopreservação de sêmen de zebrafish atualmente é a alternativa mais concreta para preservação do material genético da espécie, e que os protocolos de criopreservação de sêmen devem ser otimizados levando em consideração uma abordagem mais ampla das variáveis. Os bons resultados obtidos com a inclusão do leite em pó na solução crioprotetora indicam que a combinação entre crioprotetor permeável e não permeável pode melhorar os resultados obtidos após o processo de criopreservação.

Palavras-chave: *Danio rerio*; estresse oxidativo; danos no DNA; leite em pó; revisão sistemática.

¹Tese de Doutorado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (192 p.) Março, 2020.

ZEBRAFISH SEMEN CRIOPRESERVATION²

Author: Rômulo Batista Rodrigues

Advisor: Danilo Pedro Streit Jr.

Abstract: The zebrafish has several interesting characteristics, which make the species a popular biological model for studies in several research areas, resulting in a high development of new strains that need to be maintained and preserved. Cryopreservation can meet the need to maintain the genetic resources of the species, which makes the development of research in the area of extreme importance. The main objective of this thesis is to carry out a survey of the history of research on cryopreservation in zebrafish and to develop protocols for cryopreservation of zebrafish semen using different types of assessments on the damage caused by the cryopreservation process. The aim of the first study was to conduct a systematic review on the cryopreservation of zebrafish reproductive tissues and cells. In the systematic review, it was possible to identify and quantify the main characteristics of the cryopreservation protocols already used in different types of samples. With the results obtained in this study, it was possible to identify limitations and trends for new research, in addition to confirming that as in other fish species, cryopreservation of semen is the most effective method for preserving zebrafish genetic material. In the second study, the objective was to evaluate the combination and interaction of different extenders, permeable and non-permeable cryoprotectants, analyzing the effects of cryopreservation on sperm through a wide approach of variables. In this study, it was possible to identify that the use of powdered milk in the cryoprotective solution promoted greater protection for sperm, especially regarding oxidative and DNA damage. In the third study, the objective was to assess oxidative stress and DNA damage at different stages of the cryopreservation process. It was observed that the freeze/thaw stage generated more damage than the semen exposure to cryoprotectants during equilibrium. It was possible to identify that the use of powdered milk decreased the generation of reactive oxygen species and the fragmentation of DNA, in addition to promoting greater antioxidant activity. With all the results it was observed that the zebrafish sperm cryopreservation is currently the most concrete alternative to preserving the genetic material of the species, and that semen cryopreservation protocols must be optimized considering a broader approach of the variables. The good results obtained with the inclusion of powdered milk in the cryoprotective solution indicate that the combination of permeable and non-permeable cryoprotectants can improve the results obtained after the cryopreservation process.

Keywords: *Danio rerio*; oxidative stress; DNA damage; powdered milk; systematic review.

²Doctoral thesis in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (192 p.) Março, 2020.

RELAÇÃO DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 – Dimorfismo sexual de zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	21
Figura 2 – Crescimento de artigos publicados com zebrafish no período de 1950 a 2020.	22
Figura 3 – Danos gerados por EROs ao DNA de espermatozoides.....	34

CAPÍTULO II

Figura 1. Esquema mostrando o fluxograma utilizado para seleção de artigos utilizados no estudo.....	44
Figura 2. Panorama geral dos estudos selecionados e analisados. A) Histórico de publicações de estudos com criopreservação de diferentes materiais biológicos de zebrafish; B) Percentual de trabalhos publicados de criopreservação de diferentes amostras em zebrafish; C) Número de estudos com os métodos de congelamento e vitrificação para cada material biológico de zebrafish. PGCs = Células Germinativas Primordiais.	46
Figura 3. Quantificação dos principais componentes das técnicas de criopreservação utilizadas nos estudos analisados. A) Principais crioprotetores permeáveis utilizados em protocolos de congelamento e vitrificação em zebrafish; B) Principais crioprotetores não permeáveis utilizados em protocolos de congelamento e vitrificação em zebrafish; C) Extensores utilizados em protocolos de criopreservação em zebrafish; D) Dispositivos de criopreservação utilizados em estudos com zebrafish.	48
Figura 4. Dados percentuais de utilização de materiais e métodos para criopreservação de sêmen de zebrafish. A) Utilização de crioprotetores; B) Utilização de extensores; C) Utilização de dispositivos; D) Utilização de meios de criopreservação.....	53
Figura 5. Dados percentuais de utilização de materiais e métodos para criopreservação de tecido gonadal e espermatogônias de zebrafish. A) Utilização de crioprotetores; B) Utilização de extensores; C) Utilização de dispositivos; D) Utilização de meios de criopreservação.	54
Figura 6. Dados percentuais de utilização de materiais e métodos para criopreservação de folículos ovarianos de zebrafish. A) Utilização de crioprotetores (%); B) Utilização de extensores (%); C) Utilização de dispositivos (%); D) Utilização de meios de criopreservação (%).	59
Figura 7. Dados percentuais de utilização de materiais e métodos para criopreservação de fragmentos de tecido ovariano de zebrafish. A) Utilização de crioprotetores; B) Utilização de extensores; C) Utilização de dispositivos; D) Utilização de meios de criopreservação.	60

Figura 8. Dados percentuais de utilização de materiais e métodos para criopreservação de embriões de zebrafish. A) Utilização de crioprotetores; B) Utilização de extensores; C) Utilização de dispositivos; D) Utilização de meios de criopreservação.....65

Figura 9. Dados percentuais de utilização de materiais e métodos para criopreservação de blastômeros de zebrafish. A) Utilização de crioprotetores; B) Utilização de extensores; C) Utilização de dispositivos; D) Utilização de meios de criopreservação.....66

Figura 10. Dados percentuais de utilização de diferentes materiais e métodos para criopreservação de PGCs de zebrafish. A) Utilização de crioprotetores; B) Utilização de extensores; C) Utilização de dispositivos; D) Utilização de meios de criopreservação.....67

CAPÍTULO III

Figura 1. Características qualitativas de espermatozoides de zebrafish após a criopreservação. A) Motilidade (%); B) Tempo de motilidade; C) Viabilidade (%); D) Integridade de membrana (%); E) Espermatozoides normais (%). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos criopreservados pela ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.....93

Figura 2. Dados bioquímicos de estresse oxidativo e peroxidação lipídica em sêmen de zebrafish após a criopreservação. A) Teste de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico - TBARS (nmol de MDA/mL); B) Avaliação da Oxidação da Diclorofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA) - DCF (nmol/mg de proteína); C) Avaliação da atividade da enzima Superóxido Dismutase - SOD (U/mg de proteína); D) Avaliação da atividade da Catalase - CAT (U/mg de proteína); E) Quantificação de grupos sulfidrílicos totais - Grupos Sulfidrilas (nmol/mg de proteína). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos criopreservados pela ANOVA, seguido de teste de Tukey. *Indica diferença entre os grupos controle (Fresco diluído em HBSS X Fresco diluído em Ginsburg), pelo teste T-Student.....97

Figura 3. Variáveis objetivas do Ensaio Cometa Alcalino. Danos ao DNA em espermatozoides de zebrafish após a criopreservação. A) % de DNA na cauda do cometa; B) Comprimento da cauda do cometa (µM); C) Tail Moment; D) Olive Tail Moment. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos criopreservados pela ANOVA, seguido pela comparação de médias do teste de Tukey.99

Figura 4. Análise de Componentes Principais (PCA). A) Gráficos de dispersão dos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) para as variáveis analisadas no sêmen fresco e diluído (HBSS e Ginsburg) e nos diferentes grupos criopreservados. B) As setas marcadas mostram os *loading* dos parâmetros dos tratamentos apresentados nos eixos PC1 e PC2. para todos as variáveis analisadas no sêmen fresco e diluído (HBSS e Ginsburg) e nos diferentes grupos criopreservados. 102

CAPÍTULO IV

Figura 1. Análises bioquímicas de estresse oxidativo. A) Avaliação da Oxidação da Diclorofluoresceína diacetato (DCF) (Efeito das soluções crioprotetoras: $P < 0,0001$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P < 0,0001$); B) Quantificação de grupos sulfidrílicos totais (SH) (Efeito das soluções crioprotetoras:

$P < 0,0001$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P < 0,0001$); C) Atividade enzimática da Superóxido dismutase (SOD) (Efeito das soluções crioprotetoras: $P < 0,0001$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P < 0,0001$); D) Atividade enzimática da Catalase (CAT) (Efeito das soluções crioprotetoras: $P < 0,0001$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P < 0,0001$). Letras maiúsculas distintas indicam diferença entre a etapa da criopreservação, dentro de cada solução crioprotetora pelo teste de Tukey. Letras minúsculas distintas indicam diferença entre as soluções crioprotetoras, dentro de cada etapa da criopreservação, pelo teste de Tukey. 127

Figura 2. . A-D: Imagens obtidas através das análises dos cometas com software Comet Imager 2.2. E-H: Imagens obtidas da visualização de cometas em microscópio de epi-fluorescência, corados com brometo de etídeo. 130

Figura 3. Ensaio cometa alcalino padrão. A) Comprimento da cauda do cometa (Efeito das soluções crioprotetoras: $P < 0,0001$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P < 0,0001$); B) % de DNA na cauda do cometa (Efeito das soluções crioprotetoras: $P < 0,0001$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P < 0,0001$); C) Tail Moment (Efeito das soluções crioprotetoras: $P < 0,0001$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P < 0,0001$); D) Olive Tail Moment (Efeito das soluções crioprotetoras: $P < 0,0001$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P < 0,0001$). Letras maiúsculas distintas indicam diferença entre a etapa da criopreservação, dentro de cada solução crioprotetora pelo teste de Tukey. Letras minúsculas distintas indicam diferença entre as soluções crioprotetoras, dentro de cada etapa da criopreservação, pelo teste de Tukey. 131

Figura 4. Ensaio cometa enzimático (Formamido Pirimidina Glicosilase - FPG). A) Comprimento da cauda do cometa (Efeito das soluções crioprotetoras: $P = 0,0003$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P = 0,3570$); B) % de DNA na cauda do cometa (Efeito das soluções crioprotetoras: $P = 0,6350$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P = 0,0603$); C) Tail Moment (Efeito das soluções crioprotetoras: $P = 0,0078$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P = 0,0888$); D) Olive Tail Moment (Efeito das soluções crioprotetoras: $P = 0,0085$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P = 0,0593$). Letras maiúsculas distintas indicam diferença entre a etapa da criopreservação, dentro de cada solução crioprotetora pelo teste de Tukey. Letras minúsculas distintas indicam diferença entre as soluções crioprotetoras, dentro de cada etapa da criopreservação, pelo teste de Tukey. 133

Figura 5. Ensaio cometa enzimático (Endonuclease III – ENDO III). A) Comprimento da cauda do cometa (Efeito das soluções crioprotetoras: $P < 0,0001$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P = 0,5372$); B) % de DNA na cauda do cometa (Efeito das soluções crioprotetoras: $P < 0,0001$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P = 0,1370$); C) Tail Moment (Efeito das soluções crioprotetoras: $P < 0,0001$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P = 0,3696$); D) Olive Tail Moment (Efeito das soluções crioprotetoras: $P < 0,0001$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P = 0,3223$). Letras maiúsculas distintas indicam diferença entre a etapa da criopreservação, dentro de cada solução crioprotetora pelo teste de Tukey. Letras

minúsculas distintas indicam diferença entre as soluções crioprotetoras, dentro de cada etapa da criopreservação, pelo teste de Tukey. 135

Figura 6. Análise de Componentes Principais (PCA). A) Gráficos de dispersão dos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) para as variáveis analisadas nos quatro tratamentos (SC1, SC2, SC3 e SC4) e nos três diferentes momentos do processo de criopreservação (Fresco, após tempo de equilíbrio e após congelamento/descongelamento). B) As setas marcadas mostram os *loading* dos parâmetros dos tratamentos apresentados nos eixos PC1 e PC2. Legendas: Após aquecimento (AT); Após tempo de equilíbrio (EAT); Sêmen fresco diluído (Fresh); Grupos sulfidrílicos (SG); Superóxido Dismutase (SOD); Diclorofluoresceína diacetato (DCF); Catalase (CAT); Tail Moment (TM); Tail Moment Olive (OTM); Comprimento de cauda do cometa (TL); % de DNA na cauda do cometa (DNAIT); Endonuclease III (ENDO); Formamido Pirimidina Glicosilase (FPG). 137

RELAÇÃO DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Características gerais dos protocolos de criopreservação de sêmen e tecido gonadal masculino de zebrafish.49

Tabela 2. Principais resultados observados nos artigos publicados com criopreservação de sêmen de zebrafish.....52

Tabela 3. Características gerais dos protocolos de criopreservação em tecido e folículos ovarianos em fêmeas de zebrafish.....55

Tabela 4. Viabilidade de oócitos após criopreservação de folículos ovarianos e fragmentos de tecido ovariano de zebrafish.....58

Tabela 5. Características gerais dos protocolos de criopreservação de embriões, blastômeros e células germinativas primordiais (PGCs) de zebrafish.....61

Tabela 6. Viabilidade celular após criopreservação de células germinativas primordiais (PGCs), blastômeros e embriões de zebrafish.64

CAPÍTULO III

Tabela 1. Composição das soluções crioprotetoras utilizadas na criopreservação de sêmen de zebrafish.85

Tabela 2. Patologias espermáticas de espermatozoides de zebrafish após criopreservação com diferentes tratamentos.....95

Tabela 3. Efeito do crioprotetor permeável, crioprotetor não permeável, extensor e suas interações na qualidade do sêmen de zebrafish após a criopreservação..... 100

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Composição das soluções crioprotetoras utilizadas na criopreservação de sêmen de zebrafish. 122

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AFP – Proteína anticongelante
BD – Butanodiol
BG – Butilenoglicol
BIC – Bicina
BSA – Albumina sérica bovina
 $C_6H_{12}O_6$ – Glicose
 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – Cloreto de cálcio dihidratado
CAT – Catalase
cm – centímetro(s)
DCF – Diclorofluoresceína
DMA – Dimetilacetamida
DMF – Dimetilformamida
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
EG – Etilenoglicol
ENDO III – Endonuclease III
EROs – Espécies reativas de oxigênio
ETH – Etanol
EY – Gema de ovo
FBS – Soro fetal bovino
FPG – Foramido Pirimidina Glicosilase
FRU – Frutose
GLU – Glicose
GLY – Glicerol
GLYC – Glicina
GPx – Glutaciona peroxidase
GFR – Ginsburg Fish Ringer
GSR – Glutaciona redutase
 H_2DCF -DA – Diclorofluoresceína diacetato
 H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio
HBSS – Solução salina balanceada de Hank
HEPES – Ácido 4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonico
IGS – Índice gonadossomático
K – Fator de condição
KCl – Cloreto de potássio
Kg – Quilograma(s)
L-15 – Meio Leibovitz
 KH_2PO_4 – Fosfato monopotássico
M – Molar
mA – MiliAmpère
MDA – Malondialdeído
MET – Metanol
NL – Nitrogênio líquido
nm – Nanômetro(s)
NMP – Ponto de fusão normal
 $O_2^{\cdot -}$ – Ânion radical superóxido
PBS – Tampão salino fosfato
PD – Propanodiol

PEG – Polietilenoglicol
PG – Propilenoglicol
PGCs – Células germinativas primordiais
pH – Potencial Hidrogeniônico
PM – Leite em pó
PVP – Polivinilpirrolidona
RNA – Ácido ribonucleico
ROO• – Radical peroxil
SC – Solução crioprotetora
SH – Grupos sulfidrilas
SM – Leite em pó desnatado
SOD – Superóxido dismutase
SUC – Sacarose
TBA – Ácido 2-tiobarbitúrico
TBARS – Teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA – Ácido tricloroacético
TRE – Trealose
TRIS – Hidroximetil aminometano hidrocloreto
U – Unidade

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	17
1. INTRODUÇÃO GERAL	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1. Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	20
2.2. Criopreservação	22
2.3. Criopreservação de sêmen	23
2.4. Criopreservação de sêmen de zebrafish	26
2.5. Avaliação da qualidade do sêmen após criopreservação	28
2.6. Estresse oxidativo	30
2.7. Ensaio cometa na avaliação de genotoxicidade e danos no DNA	33
3. HIPÓTESES E OBJETIVOS	36
3.1. Hipóteses	36
3.2. Objetivos	36
CAPÍTULO II	38
Protocolos de criopreservação de tecidos e células reprodutivas de zebrafish — Revisão sistemática	39
Resumo:	40
1. Introdução	40
2. Material e métodos	41
2.1 Critérios de elegibilidade	41
2.2 Fontes de informação	42
2.3. Estratégia de pesquisa	42
2.4. Seleção dos estudos	42
2.5. Coleta de dados	43
3. Resultados	43
3.1. Resultados da busca e seleção dos estudos	43
3.2. Características gerais dos estudos selecionados	44

3.3. Criopreservação de células e tecidos em machos de zebrafish.....	48
3.4. Criopreservação de células e tecidos em fêmeas de zebrafish.....	54
3.5. Criopreservação de embriões e células primordiais de zebrafish	60
4. Discussão.....	67
Agradecimentos	74
Referências	74
1. CAPÍTULO III	79
Leite em pó desnatado como crioprotetor não permeável diminui os danos oxidativos e ao DNA em sêmen de zebrafish criopreservado	80
Resumo:	81
1. Introdução	82
2. Material e métodos.....	83
2.1. Manutenção dos zebrafish	83
2.2. Coleta e processamento do sêmen.....	83
2.3. Extensores	84
2.4. Soluções crioprotetoras.....	85
2.5. Congelamento e descongelamento do sêmen	85
2.6. Avaliação de qualidade do sêmen.....	86
2.7. Taxa de motilidade, tempo de motilidade e morfologia espermática..	86
2.8. Integridade de membrana e viabilidade (Live/Dead)	87
2.9. Análises bioquímicas de estresse oxidativo	88
2.10. Ensaio cometa.....	90
2.11. Análise estatística dos dados.....	91
3. Resultados:	91
4. Discussão:.....	102
5. Conclusões.....	109
Agradecimentos	109
Referências	109
CAPÍTULO IV*	116

Estresse oxidativo e danos no DNA de espermatozoides de zebrafish em diferentes etapas do processo de criopreservação.....	117
Resumo:.....	118
1. Introdução	118
2. Material e métodos.....	120
2.1. Criação dos zebrafish.....	120
2.2. Coleta e processamento do sêmen.....	120
2.3. Congelamento e descongelamento do sêmen	122
2.6. Avaliação de genotoxicidade e estresse oxidativo	122
2.7. Análise estatística dos dados.....	125
3. Resultados	126
3.1. Avaliação do estresse oxidativo em diferentes etapas da criopreservação 126	
3.2. Avaliação da fragmentação de DNA por meio de Ensaio Cometa ...	129
3.3. Análise de Componentes Principais (PCA)	136
4. Discussão.....	138
Agradecimentos	144
Referências	144
CAPÍTULO V	153
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	154
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	155
APÊNDICES.....	163
VITA	193

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL

Para a preservação dos recursos genéticos, utiliza-se a técnica de criopreservação, que é uma importante biotecnologia que auxilia na manutenção da diversidade de espécies e gestão de peixes na aquicultura e em peixes que são modelos experimentais na área biomédica (Tsai et al., 2010). A criopreservação de gametas de peixes evoluiu durante as últimas décadas devido ao crescente número de aplicações potenciais (Asturiano et al., 2017).

A criopreservação pode ser utilizada para auxiliar na manutenção de recursos genéticos disponíveis através de diversas linhagens desenvolvidas de animais que são considerados modelos biológicos, como o zebrafish (*Danio rerio*). Nos últimos anos, a comunidade de pesquisa em zebrafish gerou diversas linhagens, produzindo um enorme recurso genético para estudos (Matthews et al., 2018). Nesse sentido, a criopreservação de sêmen de zebrafish surge como um dos principais focos dos estudos visando a preservação do material genético da espécie.

Os diversos protocolos aplicados para criopreservação de zebrafish oferecem diversas informações que auxiliam na orientação sobre alguns procedimentos a serem adotados durante o processo de criopreservação. Contudo, ainda há a necessidade de aprimoramento dos protocolos de criopreservação para que os resultados pós-descongelamento das amostras sejam mais consistentes e menos variados. Diante da importância do zebrafish para comunidade científica em diversas áreas do conhecimento e da variabilidade das respostas encontradas pelos estudos sobre a criopreservação de sêmen de zebrafish, torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que visem esclarecer os processos que levam ao dano celular durante a criopreservação. Com isso, o presente estudo visa atender as necessidades citadas acima por meio de diferentes abordagens.

Primeiramente buscou-se através de uma revisão sistemática realizar um levantamento do histórico da criopreservação com tecidos e células reprodutivas de zebrafish, descrevendo os detalhes metodológicos dos protocolos de criopreservação disponíveis na literatura e quantificando os principais componentes dos protocolos. Com base no cenário observado procurou-se identificar as limitações e as tendências para pesquisas futuras através dos resultados potenciais observados. Posteriormente testou-se protocolos de criopreservação utilizando diferentes combinações entre extensores, crioprotetores permeáveis e não permeáveis, realizando análises de

qualidade do sêmen após o descongelamento que foram pouco exploradas ou ainda não foram utilizadas em zebrafish. Paralelamente realizou-se análises de estresse oxidativo e danos no DNA de espermatozoides de zebrafish em diferentes momentos do processo de criopreservação, buscando um maior entendimento de qual etapa pode causar maiores danos as células espermáticas, utilizando biomarcadores de oxidação e danos de DNA pouco estudados em sêmen de zebrafish, mas que possuem alta relevância para o sucesso da criopreservação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Zebrafish (*Danio rerio*)

O zebrafish (*Danio rerio*) é um teleósteo tropical de água doce, de origem asiática, pertencente à família Cyprinidae (Engeszer et al., 2007). A espécie apresenta tamanho pequeno, podendo atingir em torno de 4-5cm de comprimento (Spence et al., 2008). Apresenta hábito alimentar onívoro, não apresentando estômago verdadeiro e um longo intestino com uma grande área de absorção (Ulloa et al., 2011). Na natureza o zebrafish se alimenta de larvas de mosquito e outros insetos (Engeszer et al., 2007).

O zebrafish é encontrado em rios, riachos pequenos e outros canais, em águas estagnadas ou de movimento lento perto de córregos e arrozais, sendo que as larguras dos corpos d'água variam de 1 a 12 metros, e as profundidades variam de 16 a 57 centímetros; com características de água relativamente calma, clara, com temperatura de 27°C á 34°C e pH de 7,9-8,2; sobre substratos de argila ou pedras (Engeszer et al., 2007). A espécie é encontrada na natureza em cardumes de variados tamanhos, como grupos pequenos de 6-7 peixes em águas lentas, grupo de 22 peixes em águas paradas e até de 300 peixes em águas com alto fluxo (Graham et al., 2018).

A espécie apresenta dimorfismo sexual (Figura 1). As diferenças na coloração começam a aparecer após seis semanas de vida (Darrow & Harris, 2004), sendo que na fase reprodutiva, ao amanhecer, os machos apresentam coloração nitidamente amarelo/dourado na parte ventral, enquanto as fêmeas apresentam cor prateada (Paull et al., 2010). Na fase reprodutiva os machos são mais afilados que as fêmeas, mais leves que as fêmeas, porém apresentam o mesmo comprimento (Eaton & Farley, 1974). As fêmeas apresentam após os quatro meses de idade, uma papila genital transparente, macia e proeminente, cobrindo a abertura urogenital, sendo esta uma característica mais precisa para diferenciação sexual (Yossa et al., 2013).

Figura 1 – Dimorfismo sexual de zebrafish (*Danio rerio*).



A) Macho e B) Fêmea. **Fonte:** Adaptado pelo autor, 2020.

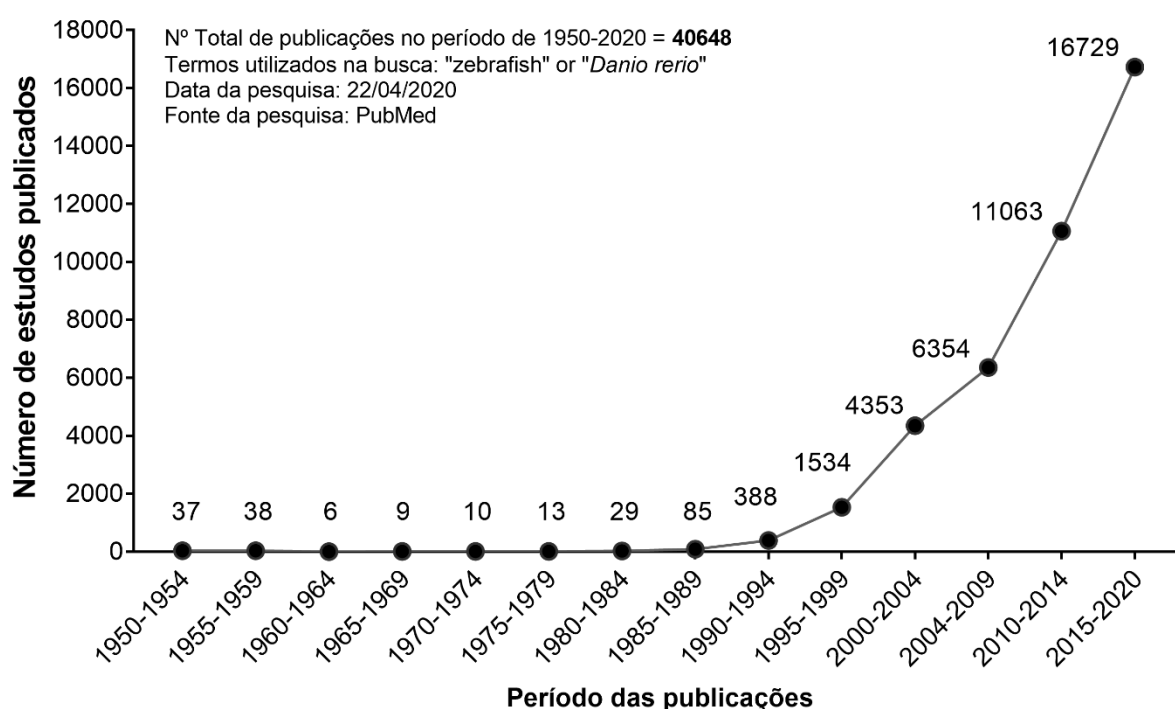
O zebrafish é um peixe ovulíparo, ou seja, a fertilização e o desenvolvimento são externos. A espécie apresenta condições de se reproduzir desde os quatro meses após a fertilização até aos 3 anos de idade, contudo, a capacidade de reprodução diminui com o avanço da idade, e a recomendação de vários laboratórios é que a reprodução seja realizada com animais entre 6 a 18 meses de idade (Nasiadka & Clark, 2012). O testículo do zebrafish é classificado como do tipo tubular anastomasado (Maack & Segner, 2003). As fêmeas podem desovar a cada 2-3 dias, sendo que cada desova pode conter centenas de oócitos (Lawrence, 2007). Contudo, a frequência ideal de desova é de uma vez por semana, pois foi o método encontrado para produzir um rendimento máximo de oócitos e eficiência de fertilização (Kurtzman et al., 2010). Em seu habitat natural o zebrafish apresenta estação reprodutiva entre abril e agosto, presumivelmente variando um pouco pela altitude e condições climáticas, sendo que a colocação dos ovos ocorre em pequenas áreas alagadas adjacentes a córregos (Engeszer et al., 2007).

O zebrafish apresenta características que favorecem a sua escolha como modelo experimental, como a alta fecundidade, pequeno tamanho, tempo entre gerações é rápido, transparência óptica durante a embriogênese e homologia genética com humanos (Lawrence, 2007). Como demonstrado em estudo de Howe et al. (2013), os humanos apresentam aproximadamente 70% dos seus genes com pelo menos um ortólogo com o zebrafish. Fazendo com que a espécie se tornasse um organismo popular no estudo de genética, biologia do desenvolvimento e biomedicina (Kalueff et al., 2014).

Segundo levantamento de Kint et al. (2013), o zebrafish é utilizado em pesquisas de diversas áreas de estudo, sendo as principais a de biologia do desenvolvimento, e bioquímica e biologia molecular. A popularidade da espécie como modelo biológico, faz com que trabalhos como o de Kimmel et al. (1995) que relatou

o desenvolvimento embrionário da espécie, fosse citado 3544 vezes até 2013, como relatou Kinth et al. (2013). De acordo com relatório de Kinth et al. (2013) a espécie é utilizada em laboratórios de pesquisa de mais de 100 países. Pode-se observar que a partir dos anos 90 ocorreu um crescimento exponencial no número de publicações com a espécie, totalizando 40648 trabalhos publicados no período entre 1950 e 2020, segundo busca realizada no PubMed, como mostra a Figura 2.

Figura 2 – Crescimento de artigos publicados com zebrafish no período de 1950 a 2020.



Fonte: Elaborado pelo autor Rodrigues, 2020.

2.2. Criopreservação

A criobiologia é um campo multidisciplinar, englobando pesquisadores de diversas áreas como a biologia molecular, engenharia, matemática, clínicos em medicina humana e veterinária, entre outros (Benson et al., 2012). A criopreservação de gametas é uma biotecnologia promissora na preservação do material genético de peixes. A técnica é crucial para o armazenamento e disponibilidade de recursos genéticos para a área biomédica (Matthews et al., 2018).

A criopreservação baseia-se na manutenção da viabilidade das células ou dos tecidos armazenadas em baixas temperaturas, induzindo à parada das reações enzimáticas, possibilitando que após o aquecimento deste tecido a atividade metabólica possa ser restaurada normalmente (Mazur et al., 1984). A taxa de resfriamento ideal deve ser rápida para evitar efeitos tóxicos da solução, mas lenta o suficiente para que as células possam desidratar e evitar a formação de gelo intracelular (Mazur et al., 1972).

Para realização da criopreservação, são utilizadas soluções crioprotetoras, que apresentam como funções principais a substituição de água, existente no meio intracelular, por meio de gradiente osmótico, realizando a desidratação parcial da célula, reduzindo o limiar de congelamento e evitando a formação de cristais de gelo no interior das células (Rosato & Iaffaldano, 2013). Crioprotetores e solutos, de forma geral, aumentam a viscosidade do meio e diminuem a temperatura de congelamento (Carmichael et al., 2009). Os crioprotetores são utilizados com a finalidade de proteger as células e tecidos durante a diminuição da temperatura; contudo, sabe-se que eles podem causar danos osmóticos e toxicidade (Guan et al., 2010).

Os agentes crioprotetores podem ser divididos em dois grupos de acordo com a sua capacidade de penetrar nas membranas celulares (Elliot et al., 2017; Xin et al., 2017): os permeáveis (intracelulares ou internos) e não permeáveis (extracelulares ou externos). Os crioprotetores permeáveis são em teoria substâncias com alta solubilidade em água e de baixo peso molecular capazes de penetrar a membrana celular e desempenhar sua ação crioprotetora por todo o citoplasma e organelas, diminuindo a temperatura de congelamento intracelular, suprimindo a formação de cristais de gelo, e por isso, também são chamados de crioprotetores permeáveis (Hubálek, 2003). Um agente crioprotetor permeável deve apresentar como características baixo peso molecular, baixa toxicidade e alta capacidade de atravessar a membrana celular (Fahy, 2010). Os crioprotetores não permeáveis são aquelas substâncias que possuem alto peso molecular, portanto não conseguem penetrar no interior da célula, mas promovem a ação protetora externamente. Por serem compostos hidrofílicos, eles se ligam as moléculas de água, aumentando a viscosidade da solução e diminuindo a formação de cristais de gelo (Fahy, 2007).

2.3. Criopreservação de sêmen

A criopreservação seminal é um desafio para diversas áreas do conhecimento, devido em parte pela morfologia dos espermatozoides, ao seu citoesqueleto complexo e aos mecanismos de ativação, além de que os protocolos de criopreservação devem ser acessíveis não apenas para grandes laboratórios equipados com alta tecnologia, mas também a campo (Benson et al., 2012).

O primeiro sucesso com a criopreservação de sêmen de peixes foi em 1953, com sêmen de arenque (Blaxter, 1953). A criopreservação seminal em peixes já é realizada com eficiência e criobancos já estão em funcionamento em vários países como mostra o trabalho de Martínez-Páramo et al. (2017), que cita como exemplos de criobancos aquáticos: o Programa Nacional de Germoplasma de Animais nos Estados Unidos; o Criobanco da Academia Nacional de Ciências na Ucrânia; o CryoAqua na França; o European Zebrafish Resource Center (EZRC) na Alemanha. Além disso o Zebrafish International Resource Center (ZIRC) que detém a maior coleção biomédica nos EUA armazenando diversas linhagens de zebrafish com o sêmen preservado em seu banco de germoplasmas (Matthews et al., 2018).

Algumas etapas básicas da criopreservação seminal de peixes podem ser descritas como: coleta do sêmen; diluição do sêmen; armazenamento refrigerado; congelamento; armazenamento congelado; descongelamento; utilização da amostra e fertilização; e avaliação da qualidade seminal. Cada etapa é importante, bem como as conexões entre elas, pois a falha em qualquer fase do procedimento pode levar ao insucesso no final (Tiersch, 2001).

Para desenvolver protocolos de criopreservação, a escolha de uma solução extensora é o primeiro passo. Os extensores geralmente são soluções que impedem a ativação prematura da motilidade espermática, protegem as células de possíveis subprodutos tóxicos, fornecem os nutrientes necessários, diluem a amostra até a concentração esperada de espermatozoides e atuam como um meio transportador para os crioprotetores necessários durante a criopreservação (Yang et al., 2016).

A criopreservação das amostras geralmente é realizada através da colocação das amostras em gelo seco, suspensão em vapor de nitrogênio e refrigeração com freezer de taxa controlada (Martínez-Páramo et al., 2017), sendo as duas primeiras opções mais baratas e práticas, podendo serem utilizadas em coletas a campo e em laboratórios menos estruturados. Os freezers programáveis são utilizados para obtenção de taxa de resfriamento precisa e repetitivas, contudo, essa tecnologia não está disponível para todos laboratórios, e seu uso a campo é limitado. Além dessas

maneiras, as amostras podem ser criopreservadas em ultrafreezer como mostra trabalhos recentes de Diogo et al. (2018, 2019) e por meio de vitrificação, colocando as amostras diretamente no nitrogênio líquido (Xin et al., 2017).

Segundo Cabrita et al. (2010), os benefícios da criopreservação seminal incluem: o sêmen pode ser armazenado e usado no momento em que os oócitos estiverem disponíveis; permite o uso do volume total do sêmen disponível, especialmente útil quando o sêmen é difícil de obter e quando baixos volumes são adquiridos em cativeiro; facilita a manutenção da criação de descendentes pois a fertilização fora da estação reprodutiva pode ser induzida apenas em fêmeas e o uso de sêmen criopreservado; permite o transporte de gametas para diferentes locais, evitando o transporte de animais; armazenamento de germoplasma: permite a manutenção das características de interesse dos animais, armazenando o genoma de cepas valiosas e avaliando o progresso genético durante a domesticação.

Uma característica dos espermatozoides de peixes de água doce é que são imóveis dentro do trato reprodutivo, e são ativados quando liberados no ambiente aquoso hipotônico durante a reprodução (Alavi & Cosson, 2006). Desta forma, a motilidade pode ser iniciada e interrompida por ajustes na osmolaridade da solução diluidora ou ativadora. Para maioria dos peixes de água doce, a motilidade espermática tem duração baixa, com cerca de 1 a 2 minutos (Billard & Cosson, 1992). Para o zebrafish, a motilidade espermática pode ser iniciada em soluções hipotônicas com osmolalidade menor que 288 mmol/kg (Jing et al., 2009). Desta maneira, soluções diluidoras devem ser preparadas para que sua osmolalidade seja maior que 288 mmol/kg, para que não ocorra a ativação prematura da motilidade e resulte em perda de viabilidade.

Diversos diluidores e crioprotetores foram utilizados para a criopreservação seminal nas diferentes espécies de peixes, sendo que o DMSO foi considerado o crioprotetor mais eficiente para a maioria das espécies (Suquet et al., 2000). Contudo, outros agentes crioprotetores ofereceram resultados positivos. Diversos detalhes no processo de criopreservação de sêmen podem influenciar na qualidade dos espermatozoides após o descongelamento e na frequência de danos causados ao material, como a velocidade de congelamento e descongelamento, o tipo de dispositivo utilizado no armazenamento, a incorporação da solução crioprotetora e a quantidade de crioprotetor na solução. Gao & Critser (2000) descrevem que os resultados pós-descongelamento são influenciados por diversos fatores como à

toxicidade da solução, estresse osmótico e formação de gelo extra e intracelular durante os processos de congelamento e descongelamento (Gao & Critser, 2000).

2.4. Criopreservação de sêmen de zebrafish

O primeiro protocolo de criopreservação de sêmen para zebrafish foi publicado em 1982 por Harvey et al. (1982) e foi utilizado como base para toda comunidade científica da área na produção de novos protocolos. Os protocolos desenvolvidos até o momento variam desde o método de coleta do sêmen, a combinação de diferentes diluentes e crioprotetores, o dispositivo utilizado para o congelamento, o meio de criopreservação e conseqüentemente a curva de resfriamento, e produzem, desta maneira, resultados variáveis.

Os espermatozoides de peixes de aquário podem ser coletados por massagem abdominal ou dissecação dos testículos. Contudo, pelas dificuldades de coletar o sêmen dos peixes pequenos e para maximizar o volume de amostra disponível, permitindo a replicação experimental, o esmagamento do testículo dissecado tem sido o método utilizado para coleta de sêmen na maioria dos estudos com peixes de aquário (Yang et al., 2007). Para o zebrafish, os dois métodos de coleta de sêmen foram utilizados em diferentes trabalhos, a massagem abdominal foi utilizada em diversos trabalhos (Harvey et al., 1982; Ransom & Zon, 1999; Draper et al., 2004; Carmichael et al., 2009; Draper & Moens, 2009; Hagedorn et al., 2012; Matthews et al., 2018; Diogo et al., 2018, 2019; Silva et al., 2019), enquanto a dissecação dos testículos para retirada do sêmen foi utilizada em outros estudos (Morris et al., 2003; Ransom & Zon, 1999; Draper et al., 2004; Yang et al., 2007; Bai et al., 2013; Wang et al., 2015; Yang et al., 2016). A coleta de sêmen do zebrafish por massagem abdominal é difícil. Jing et al. (2009) relata que na maioria das tentativas a coleta de sêmen por massagem abdominal ocorre em apenas metade dos peixes. Por outro lado, em peixes pequenos, a dissecação dos testículos é um método simples e rápido para se obter um maior volume de sêmen (Huang et al., 2004).

Sobre os extensores utilizados nos protocolos, a solução de Ginsburg Fish Ringer, adaptadas de Ginsburg (1963) foi utilizada no primeiro protocolo de criopreservação (Harvey et al., 1982) e foi repetida em outros protocolos (Ransom & Zon, 1999; Morris et al., 2003; Draper et al., 2004; Carmichael et al., 2009; Draper & Moens, 2009); a solução salina balanceada de Hank (HBSS) foi utilizada pela maioria

dos trabalhos (Morris et al., 2003; Yang et al., 2007; Hagedorn et al., 2012; Bai et al., 2013; Wang et al., 2015; Yang et al., 2016; Diogo et al., 2018, 2019), enquanto outras soluções foram escolhidas de maneira isolada por alguns estudos, como a solução BSMIS (Morris et al., 2003), a solução E400 (Matthews et al., 2018) e a solução de Grayling (Silva et al., 2019).

Com relação aos crioprotetores permeáveis utilizados nos protocolos de criopreservação de sêmen de zebrafish, Morris et al. (2003) testou metanol, DMSO, DMA, glicerol e etilenoglicol nas concentrações de 5, 10, 15 e 20%. O metanol foi o utilizado na concentração de 4% (Yang et al., 2007; Bai et al., 2013), na concentração de 8% (Yang et al., 2007; 2016; Hagedorn et al., 2012; Silva et al., 2019), na concentração de 10% (Harvey et al., 1982; Ransom & Zon, 1999; Carmichael et al., 2009; Draper & Moens, 2009), além de ser utilizado como crioprotetor permeável na solução crioprotetora RMMB utilizada por Matthews et al. (2018), em uma concentração de 6,67%. O DMSO foi utilizado em uma concentração de 8% (Yang et al., 2007; Bai et al., 2013; Wang et al., 2015). O DMA foi utilizado em uma concentração de 8% (Yang et al., 2007). O DMF foi utilizado em concentração de 10% (Diogo et al., 2018), e na concentração de 5%, 7,5%, 10%, 12,5% e 15% (Diogo et al., 2019). Sobre os crioprotetores não permeáveis, foram testados o leite em pó na concentração de 15% (Harvey et al., 1982; Ransom & Zon, 1999; Carmichael et al., 2009; Draper & Moens, 2009), e foram testados também a Albumina Sérica Bovina (10mg/mL), a gema de ovo (10%), a glicose (30mM) e a Bicina (50mM) por Diogo et al. (2019).

Com relação ao método de congelamento, os meios de criopreservação utilizados foram o gelo seco (Harvey et al., 1982; Morris et al., 2003; Carmichael et al., 2009), o gelo seco triturado (Ransom & Zon, 1999; Draper & Moens, 2009; Matthews et al., 2018; Silva et al., 2019), o freezer programável de taxa controlada (Yang et al., 2007, 2016; Hagedorn et al., 2012; Bai et al., 2013; Wang et al., 2015; Diogo et al., 2018) e ultrafreezer -150 °C (Diogo et al., 2018, 2019).

Para o descongelamento houve variação da temperatura e tempo utilizados, com a temperatura variando de 30 a 40 °C e tempo de descongelamento de 5 a 40 segundos, ou até mesmo o descongelamento a temperatura ambiente por tempo não determinado (Harvey et al., 1982; Morris et al., 2003).

A grande variação nos protocolos de congelamento de sêmen de zebrafish, aliados aos diferentes métodos e análises utilizados para a avaliação de qualidade do

sêmen após o descongelamento, resultam em uma discrepância de resultados obtidos. Algumas avaliações como motilidade, taxa de fertilização e eclosão não foram realizadas em alguns trabalhos, e quando realizadas, em alguns casos, foram com técnicas diferentes, dificultando a comparação entre os resultados. Os resultados fornecidos nos trabalhos apresentam grande variação, com a motilidade após descongelamento variando de 12,1% (Morris et al., 2003) a 78% (Yang et al., 2007), e a taxa de fertilização variando de 14% (Morris et al., 2003) a cerca de 90% (Diogo et al., 2018). Além dessas diferenças, a taxa de larvas eclodidas após a fertilização foi relatada em poucos estudos (Wang et al., 2015; Diogo et al., 2018, 2019), demonstrando a dificuldade em produzir indivíduos utilizando material criopreservado da espécie.

Até mesmo protocolos mais similares, que utilizam o mesmo crioprotetor ou método de coleta, por exemplo, acabam reproduzindo resultados variados, dificultando a escolha de um dos protocolos para criopreservação de sêmen de zebrafish. É interessante que pesquisas sejam realizadas visando à determinação de um protocolo que seja adequado a situação e estrutura de cada laboratório, mais simples e de menor custo podendo ser utilizado em laboratórios menos equipados, tendo em vista que os protocolos disponíveis na literatura utilizam muitas vezes equipamentos e componentes que não estão disponíveis para todos.

2.5. Avaliação da qualidade do sêmen após criopreservação

Apesar da importância da criopreservação na preservação dos recursos genéticos, e de que diversos protocolos de criopreservação são desenvolvidos e aprimorados constantemente, o processo de congelamento pode trazer diversos problemas às células. Chao & Liao (2001) citam as principais fontes de danos as células durante a criopreservação: flutuação do pH, choque térmico, formação de cristais de gelo, efeito da diferença de osmolalidade e a toxicidade dos crioprotetores. Além disso, as características do sêmen variam entre espécies, estoques e até mesmo em amostras do mesmo animal, dependendo do período de coleta, o que faz com que análises de qualidade seminal e desenvolvimento de ferramentas para caracterizar essa qualidade seja uma prioridade (Cabrita et al., 2010).

Os problemas que podem ser gerados durante o processo de criopreservação podem ser analisados com uma diversidade de análises e técnicas.

A análise de motilidade espermática é muito útil para comparar diferentes condições experimentais, tais como procedimentos de coleta, meio de diluição e armazenamento de sêmen (Bobe & Labbé, 2010). A motilidade é um dos parâmetros mais utilizados para avaliar a qualidade do sêmen após a criopreservação e geralmente se correlaciona bem com a fertilidade (Kime et al., 2001).

A morfologia espermática é uma avaliação utilizada para verificar o percentual de espermatozoides com morfologia normal e anormal, além da observação dos tipos de anormalidades e patologias espermáticas. Pode dessa maneira auxiliar a identificar alterações provocadas pelo processo de criopreservação.

A avaliação de integridade de membrana pode ajudar a indicar o sucesso da criopreservação, uma vez que as membranas são suscetíveis às crio-lesões (Li et al., 2006). A membrana celular é composta por uma bicamada fina de lipídios que separa e protege a célula do ambiente extracelular e controla o que entra e sai da célula, tornando, dessa maneira, a integridade e a permeabilidade da membrana plasmática uma necessidade primária de sobrevivência celular (Cabrita et al., 2010). A integridade da membrana pode ser avaliada utilizando corantes como eosina/nigrosina ou eosina isolada e observação simples sob microscópio de luz; ou utilizando kits com marcadores específicos (Sybr-14/iodeto de propídio), permitindo uma observação simultânea de espermatozoides vivos e mortos (Fauvel et al., 2010).

Diversos estudos concordam em considerar que a análise de DNA por eletroforese alcalina em células únicas conhecidas como "Ensaio Cometa" é um método confiável, sensível e barato para detectar quebras de cadeia de DNA (Fauvel et al., 2010). Este método foi descrito inicialmente por Ostling & Johanson (1984), sendo chamado de "Estudo de Microeletroforese", sendo amplamente utilizado para a determinação da fragmentação do DNA, especialmente após o trabalho publicado por Singh et al. (1988). Este estudo estabeleceu diversos procedimentos para realização da técnica do ensaio cometa, consolidando-se como uma referência importante para a área, tendo sua técnica difundida e utilizada em todo o mundo para avaliação da fragmentação de DNA de diversos tipos de células.

O ensaio cometa é o método mais utilizado para avaliar a estabilidade do DNA em espermatozoides de peixes (Bobe & Labbé, 2010). Zilli et al. (2003) trabalhando com criopreservação seminal de *Dicentrarchus labrax*, encontraram um nível significativo de fragmentação de DNA em sêmen criopreservado em relação ao sêmen fresco, apesar de não observarem diferenças na taxa de motilidade e fertilidade. Da

mesma forma Pérez-Cerezales et al. (2009) encontraram maior fragmentação de DNA além de maior nível de oxidação de bases do DNA pelo aumento das espécies reativas de oxigênio, quando trabalharam com resfriamento de sêmen de trutas.

Análises de estresse oxidativo são constantemente utilizadas para avaliação da qualidade seminal após criopreservação. Os espermatozoides são particularmente suscetíveis à peroxidação lipídica porque eles contêm altas concentrações de ácidos graxos não saturados e, como células diferenciadas no final, possuem mecanismos de reparo limitados (Aitken & Clarkson, 1987). Além disso, há indícios que a atividade antioxidante dos espermatozoides diminui com o processo de criopreservação (Gadea et al., 2004), e o peróxido de hidrogênio pode ser a principal fonte de dano celular oxidativo durante a criopreservação (Hagedorn et al., 2012). Um aumento nas espécies reativas foi associado a espermatozoides anormais ou danificados (Ball & Vo, 2001).

A avaliação da taxa de fertilidade é utilizada como teste mais conclusivo para determinar a qualidade seminal, tendo em vista que o objetivo do espermatozoide é conseguir penetrar o oócito para que ocorra a fertilização, e posteriormente gerar descendentes. Além da taxa de fertilidade, o desenvolvimento embrionário e a taxa de larvas eclodidas são parâmetros importantes, pois, mostram se o sêmen utilizado na fertilização está proporcionando um desenvolvimento embrionário adequado e tem a capacidade de gerar descendentes. A ocorrência de malformações embrionárias ou larvais é uma ferramenta valiosa para caracterizar completamente o potencial de desenvolvimento de ovos fertilizados (Bobe & Labbé, 2010).

2.6. Estresse oxidativo

O oxigênio é uma molécula amplamente utilizada para a síntese de ATP na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e em diversas outras vias metabólicas fundamentais. Do mesmo modo, o consumo de oxigênio é capaz de gerar substâncias tóxicas a nível intra e extracelular, criando o chamado “paradigma do oxigênio”, devido ao balanço existente entre suas vantagens e desvantagens (Pruchniak et al., 2015). Tais substâncias tóxicas são chamadas de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Halliwell & Gutteridge, 2007). Quando há um desbalanço entre os níveis das defesas antioxidantes e a produção de EROs, o organismo está em uma condição conhecida como estresse oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 2007). Em um organismo em

condição de estresse oxidativo, as EROs podem reagir com macromoléculas como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos e gerar peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e danos ao DNA, respectivamente (Monteiro et al., 2006).

As EROs em geral são formadas por reações redox ou por processos de catálise enzimática (Slater, 1984). A maior parte das EROs são espécies radicalares, como átomos, moléculas ou íons que possuem um ou mais elétrons não pareados em seus orbitais externos, tornando-as reativas, sendo capazes de se combinar com diversas moléculas integrantes das estruturas celulares ou derivadas de cada uma delas (Halliwell & Gutteridge, 2007). Apesar de não ser uma espécie radicalar, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) também é considerada uma EROs, e tem um papel importante no estresse oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 2007), em especial durante o processo de criopreservação, já que o peróxido de hidrogênio é a ERO mais comumente formada (Hagedorn et al., 2012).

Os peixes possuem ambos os sistemas de defesa antioxidante endógenos: enzimático e não enzimático (Guerriero et al., 2002). O sistema enzimático é composto por enzimas, como por exemplo, a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase, e por enzimas auxiliaadoras, como a glutathione redutase, a glicose-6-fosfato desidrogenase e a glutathione S-transferase. Contudo, os espermatozoides têm um sistema de defesa antioxidante fraco e são altamente propensos ao estresse oxidativo (Valença e Guerra, 2007). Devido ao baixo teor de citoplasma dos espermatozoides e baixas moléculas antioxidantes presentes nos espermatozoides, o plasma seminal fornece a maior defesa contra EROs no sêmen de peixes (Shiva et al., 2011). A SOD é uma enzima antioxidante que reduz o dano oxidativo convertendo o $O_2^{\cdot-}$ (ânion radical superóxido) em H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) (Chakraborty et al., 2007). A CAT realiza a decomposição de H_2O_2 em O_2 (oxigênio molecular) e H_2O (água), e juntamente com a SOD desempenha um papel central na proteção contra as EROs (Rajeswari & Paliwal, 2008).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação é o maior evento de estresse oxidativo sobre lipídios poli-insaturados em membranas celulares. É um processo complexo que envolve a formação e propagação de radicais lipídicos, a captação de oxigênio, um rearranjo das ligações duplas em lipídios insaturados e a eventual destruição de lipídios de membrana, produzindo uma variedade de produtos de degradação, incluindo álcoois, cetonas, aldeídos e éteres (Buege & Aust, 1975).

De acordo com Esterbauer et al. (1991), a peroxidação lipídica ocorre em três etapas: iniciação, propagação e terminação. O começo geralmente ocorre através da abstração de átomo de hidrogênio de um grupo metileno pelo ataque de uma molécula reativa, como as EROs ou outros radicais livres, formando um radical de carbono, que por sua vez, realizará um rearranjo molecular, formando um dieno conjugado, o qual pode reagir com moléculas de oxigênio, formando um radical peroxil (ROO•) (Buege & Aust, 1975). Posterior a formação deste radical acontece a fase de propagação, devido à sua capacidade de abstrair átomos de hidrogênio de outros grupos metilenos de cadeias adjacentes, estes passaram por rearranjo molecular, formação de dienos conjugados e, posteriormente, ataque de moléculas de oxigênio, formando um novo ROO• (Buege & Aust, 1975). Este novo ROO• reinicia o processo, gerando uma cadeia de novas reações oxidativas (Catalá, 2006).

A formação do malondialdeído (MDA) ocorre como um processo de decomposição que acontece através da transformação de endoperóxidos lipídicos em ácidos graxos insaturados, contendo pelo menos 3 ligações duplas interrompidas por metileno (Buege & Aust, 1975). O MDA é um dos diversos produtos de baixo peso molecular formado pela peroxidação lipídica, quando está em pH baixo e temperatura elevada, o MDA participa prontamente da reação de adição nucleofílica com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), gerando um produto de coloração vermelha. Esses fatos, juntamente com a disponibilidade de métodos fáceis e sensíveis para quantificar o MDA levaram ao uso rotineiro da determinação de MDA e, particularmente, o teste TBARS (teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) para detectar e quantificar a peroxidação lipídica em uma ampla variedade de tipos de amostra (Janero, 1990). A peroxidação lipídica é um marcador utilizado para avaliar o dano oxidativo em sêmen de peixes (Hagedorn et al., 2012; Li et al., 2010; Mansour et al., 2006).

Os espermatozoides podem ser expostos ao estresse oxidativo da espermatogênese, devido às altas taxas de consumo de oxigênio mitocondrial inerente ao processo replicativo extremamente ativo (Aitken & Roman, 2008). Além disso, o processo de criopreservação tem demonstrado ser um grande causador de estresse oxidativo nas células. Por exemplo, durante a criopreservação, a barreira antioxidante proporcionada pelo plasma seminal é enfraquecida pela diluição do sêmen no extensor, reduzindo a concentração de compostos de plasma seminal

(Cabrita et al., 2011). Best (2015) constatou ainda que há evidências de que o dano oxidativo pode ser efeito da toxicidade dos crioprotetores.

2.7. Ensaio cometa na avaliação de genotoxicidade e danos no DNA

São usadas diversas técnicas para medir os níveis de danos no DNA. O ensaio cometa “*Single Cell Gel Electrophoresis*”, desenvolvido por Singh et al. (1988), é uma técnica rápida e eficiente, usada para quantificar as lesões e detectar os efeitos do reparo no DNA em células individualizadas. O princípio da técnica é simples: as células são incluídas em gel sobre uma lâmina de microscopia, faz-se passar uma corrente elétrica e, como o DNA tem carga negativa, se estiver rompido, migra para fora do núcleo, ficando com a aparência de um cometa ou cauda. O DNA que não estiver rompido ou quebrado fica armazenado no núcleo, sendo muito grande para migrar. O DNA não danificado aparece como cabeças de cometa intactas, enquanto o DNA danificado pode ser visto como uma cauda de cometa (Li et al., 2006). Quanto mais fragmentado estiver o DNA, maior será a cauda (Labbé et al., 2001).

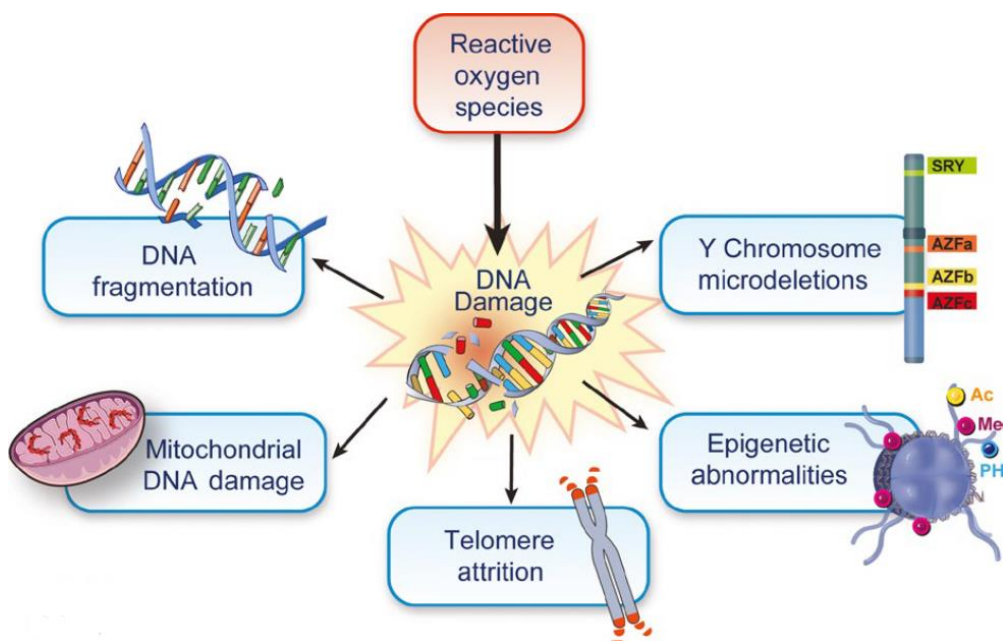
O ensaio cometa pode ser realizado a partir de diferentes técnicas. Na variante neutra, a molécula de DNA é preservada como uma estrutura de cadeia dupla, permitindo a detecção de quebras de fita dupla no DNA (Zhao et al., 2013) e por permitir a detecção de quebras da fita dupla de DNA apenas, é mais relevante para a exposição à radiação ionizante (Wang et al., 2013). Na variante alcalina do método, a etapa de desnaturação em pH 13 permite revelar, simultaneamente, quebras de DNA de fita dupla e simples, bem como locais abásicos, o que torna o ensaio alcalino mais sensível em comparação a sua variante neutra na detecção de danos no DNA (Muthusamy et al., 2017).

Estudos mais recentes indicam a utilização de um método mais sensível do que o ensaio cometa alcalino, que é realizado com um passo a mais após a lise de digestão com endonucleases reparadoras específicas. Essas modificações podem detectar bases de DNA com danos oxidativos (Muthusamy et al., 2017). Quando associado à glicosilases de reparo de DNA, como a Formamido Pirimidina Glicosilase (FPG) de *Escherichia coli* e a Endonuclease III (ENDO III) de *E. coli* que reconhecem purinas e pirimidinas modificadas, respectivamente, o método permite a detecção de danos oxidativos nas bases (Collins et al., 1996), e é possível usar o ensaio cometa

modificado para medir níveis muito baixos de danos no DNA, devido à alta sensibilidade do teste.

A avaliação dos danos no DNA de espermatozoides criopreservados é de suma importância. Foi proposto que um aumento na concentração de cálcio intracelular, causado pela criopreservação, poderia aumentar os danos ao DNA nuclear (Hammadeh et al., 2001). Além disso, a produção de EROs induzidas pela criopreservação pode ser responsável por um aumento da fragmentação do DNA (Ahmadi & Sonn-Chye, 1999). A espécie reativa de oxigênio com maior capacidade de causar danos ao DNA é o radical hidroxil (Pruchniak et al., 2015). As moléculas de DNA podem ser afetadas de diferentes maneiras pela oxidação, seja geração de quebras de fita ou oxidação das bases (Box et al., 2001). De acordo com Bui et al. (2018) as EROs podem produzir diversos danos no DNA de espermatozoides, como demonstrado na Figura 3.

Figura 3 – Danos gerados por EROs ao DNA de espermatozoides.



Fonte: Bui et al. (2018).

A fragmentação do DNA dos espermatozoides é considerada uma característica relevante da qualidade seminal, uma vez que é essencial que a informação genética seja transmitida sem erros para a próxima geração (Gosálvez et al., 2014). A manutenção da integridade do DNA é de suma importância, pois diminui a chance de mutações ou morte durante a fase de desenvolvimento embrionário nos

peixes (Santos et al., 2013). Desta maneira, a integridade do DNA dos espermatozoides deve ser preservada, especialmente quando o banco de genes é o objetivo (Herráez et al., 2017). Está bem estabelecido que os danos no DNA dos espermatozoides podem levar à má fertilização, mas, o mais importante, também pode prejudicar o desenvolvimento embrionário, aumentando o número de morte embrionária ou até produzir problemas ao desenvolvimento da prole (Xiao et al., 2012).

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

3.1. Hipóteses

As hipóteses propostas pelo presente trabalho é de que existe diferença significativa na eficiência de proteção dos espermatozoides entre diferentes combinações de extensores, crioprotetores permeáveis e não permeáveis nas soluções crioprotetoras. Além disso, acredita-se que os efeitos do processo de criopreservação podem levar a alterações na qualidade dos espermatozoides de zebrafish após o descongelamento das amostras, principalmente pelos danos oxidativos e do DNA.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo geral

- Revisar, de maneira sistemática, os dados disponíveis na literatura sobre os protocolos de criopreservação de tecidos e células reprodutivas de zebrafish, analisando o histórico da área de pesquisa e identificando gargalos e tendências.
- Desenvolver um protocolo simples de criopreservação de sêmen de zebrafish, analisando os principais efeitos negativos da criopreservação sobre os espermatozoides, permitindo desta forma, identificar a origem dos danos causados pela criopreservação e esclarecer quais os pontos que devem ser melhorados durante o processo de criopreservação e dessa forma mitigar os danos causados pelo processo de criopreservação e aumentar o número de células viáveis após o descongelamento das amostras.

3.2.2. Objetivos específicos

- Fornecer por meio de revisão sistemática, uma visão geral do histórico e do cenário atual da criopreservação de tecidos e células reprodutivas de zebrafish, detalhando os protocolos de criopreservação já utilizados, permitindo uma avaliação crítica das limitações e das possíveis tendências e caminhos a serem seguidos nessa área de pesquisa.

- Testar diferentes combinações entre extensores, crioprotetores permeáveis e não permeáveis para criopreservação de sêmen de zebrafish, utilizando os componentes mais utilizados e indicados na literatura.
- Avaliar os parâmetros qualitativos do sêmen de zebrafish após a criopreservação, por meio de análises de morfologia, motilidade, integridade de membrana, estresse oxidativo e danos no DNA.
- Analisar biomarcadores de estresse oxidativo no sêmen de zebrafish em diferentes momentos do processo de criopreservação.
- Mensurar a fragmentação de DNA de espermatozoides de zebrafish por meio do ensaio cometa alcalino e quantificar a oxidação de purinas e pirimidinas pelo ensaio cometa enzimático, modificado com as enzimas FPG e ENDO III, no sêmen de zebrafish em diferentes momentos do processo de criopreservação.

CAPÍTULO II*

Protocolos de criopreservação de tecidos e células reprodutivas de zebrafish — Revisão sistemática

*Artigo elaborado seguindo modelo de estrutura e formatação do periódico *Reviews in Aquaculture*.

Protocolos de criopreservação de tecidos e células reprodutivas de zebrafish — Revisão sistemática

Rômulo Batista Rodrigues^{1*}, Paula Graziela Lassen¹, Lis Santos Marques¹, Mariana Uczay², Leandro Cesar de Godoy¹, Andrea Giannotti Galuppo¹, Tiantian Zhang³, Danilo Pedro Streit Jr.¹

¹Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Terapêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Faculty of Science and Technology, Bournemouth University, Dorset, UK.

*Autor correspondente: Rômulo Batista Rodrigues, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Endereço: Avenida Bento Gonçalves 7712, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. Fone: (+55) 051 998477595; E-mail: rrodrigues1903@gmail.com.

Protocolos de criopreservação em zebrafish

Resumo: O zebrafish é um modelo biológico popular para estudos de diversas áreas de pesquisa, o que faz com que sejam produzidas novas linhagens que precisam ser mantidas e preservadas. O objetivo desta revisão sistemática foi realizar um levantamento histórico e do cenário atual dos protocolos de criopreservação de tecidos e células reprodutivas de zebrafish. As pesquisas nas bases de dados PubMed, Scopus e Web of Science foram realizadas com a seguinte combinação de palavras-chave: *zebrafish*, *Danio rerio*, *Brachydanio rerio*, *frost*, *freezing*, *cooling*, *chilling*, *frozen*, *vitrification*, *sperm*, *semen*, *oocyte*, *embryo*, *ovarian* e *primordial germ cell*. Após a exclusão de artigos duplicados ou que não se enquadravam no tema, foram selecionados 46 artigos para este trabalho. Foram encontrados estudos com diferentes tipos de células e tecidos: blastômero, células germinativas primordiais, embrião, folículos ovariano, fragmentos de tecido ovariano, sêmen e testículo/espermatogônias. O sêmen foi o material mais utilizado. Foi possível identificar e quantificar as principais características dos protocolos: método, meio de criopreservação, dispositivos, extensores e crioprotetores. Nos estudos foram encontrados 34 testes com congelamento e 18 com vitrificação. Entre os componentes mais utilizados estão o metanol como crioprotetor, o HBSS como extensor e a palheta (0,25mL) como dispositivo. A viabilidade após criopreservação nos estudos foi variável, contudo, apenas a criopreservação de embriões não apresentou viabilidade após a criopreservação. As evidências científicas apresentadas nesta revisão possibilitam identificar limitações e tendências para novas pesquisas, além de confirmar que a criopreservação de sêmen é o método mais efetivo para preservação do material genético do zebrafish.

Palavras chave: Bancos de germoplasmas, Congelamento lento, *Danio rerio*, Soluções crioprotetoras, Vitrificação.

1. Introdução

O zebrafish (*Danio rerio*) é um dos organismos aquáticos mais amplamente utilizados em pesquisas pois apresenta diversas características vantajosas. Dentre essas características destacamos a homologia genética com humanos (Howe *et al.*, 2013), alta fertilidade (Spence *et al.*, 2008) e transparência embrionária (Lawrence, 2007). Estas qualidades fizeram do zebrafish um excelente modelo animal para estudos nas áreas de biologia do desenvolvimento, genética e doenças (Amatruda *et al.*, 2002; Lieschke e Currie, 2007; Kalueff *et al.*, 2014).

O uso generalizado do zebrafish como modelo biológico, levou ao desenvolvimento de numerosas linhagens mutantes e transgênicas em laboratórios em todo mundo, criando desafios em termos de espaço e gerenciamento desses recursos genéticos (Silva *et al.*, 2019). Nesse sentido, o estabelecimento de bancos de germoplasmas através da criopreservação pode ser decisivo para o armazenamento desses recursos genéticos, reduzindo o espaço necessário para

manter essas linhagens e evitar perdas acidentais (Matthews *et al.*, 2018; Diogo *et al.*, 2019).

Porém, para isso é necessário o desenvolvimento de protocolos de criopreservação com excelentes resultados de viabilidade pós-descongelamento, de forma a garantir a manutenção das linhagens sem riscos de perdas. Devido a relação entre as etapas do processo de criopreservação, danos as células podem ocorrer em qualquer etapa e são cumulativos, podendo resultar em insucesso ao final do processo. Também é importante considerar que as metodologias de criopreservação devem ser adaptadas para cada espécie e tipo de célula, uma vez que a resposta ao processo de congelamento depende das características biofísicas da célula, que são específicas (Devismita e Kumar, 2015). Nesse sentido, diversos estudos buscam desenvolver métodos de criopreservação com tecidos e células de zebrafish, visando entender como ocorrem os danos as células durante o processo de criopreservação por meio de diferentes técnicas de avaliação. E dessa maneira buscam mitigar os danos causados em cada etapa por meio de alterações e adaptações nos protocolos de criopreservação.

Sendo assim, essa revisão apresenta a compilação de dados de 46 artigos científicos com criopreservação de tecidos ou células de zebrafish, trazendo o agrupamento de informações detalhadas dos protocolos de criopreservação e a quantificação de diversos parâmetros como as técnicas de criopreservação, extensores, crioprotetores, dispositivos e meio de criopreservação, com cada tipo de amostra criopreservada. Dessa forma, essa revisão sistemática tem como objetivo fornecer uma visão geral do histórico e cenário atual da criopreservação com o zebrafish como modelo, além de fornecer um detalhamento dos protocolos de criopreservação já utilizados, permitindo uma avaliação crítica das limitações e das possíveis tendências e caminhos a serem seguidos nessa área de pesquisa.

2. Material e métodos

2.1 Critérios de elegibilidade

Desenho do estudo primário, características e populações: Foram elegíveis para a inclusão no presente estudo trabalhos de intervenção experimental primária disponíveis em inglês, espanhol e português, incluindo ensaios pré-clínicos randomizados e não randomizados. Os desenhos de estudos observacionais não eram elegíveis. Os estudos devem ter envolvido o modelo zebrafish (*Danio rerio*)

usando congelamento, vitrificação ou processo semelhante para conservar ou manipular células ou tecidos reprodutivos. Grupos de Intervenção e Comparador: os estudos elegíveis deveriam incluir pelo menos um procedimento de criopreservação com um ou mais tecidos e células.

2.2 Fontes de informação

As pesquisas eletrônicas foram concluídas usando PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), Scopus (<https://www.scopus.com/>) e Web of Science (<https://www.webofknowledge.com/>), com a opção de vocabulário controlado utilizado quando disponível. A pesquisa bibliográfica foi realizada entre 6 e 8 de dezembro de 2019 e limitada a publicações nos idiomas inglês, espanhol e português. Os resultados da pesquisa foram carregados no EndNoteWeb (Clarivate Analytics) e os resultados duplicados foram documentados e removidos. Nenhuma restrição à data de publicação foi colocada além da base de dados.

2.3. Estratégia de pesquisa

Os termos de pesquisa foram: zebrafish OR "danio rerio" OR "brachydanio rerio" AND cryopreserv* OR criopreserv* OR freez* OR Cool* OR frost* OR froz* OR Chill* OR vitrific* AND sperm* OR semen* OR oocyt* OR embryo* OR ovarian* OR blastom* OR "primordial germ cell*".

2.4. Seleção dos estudos

Os estudos foram exportados para o EndNoteWEB por 2 rodadas de triagem. A rodada primária foi conduzida de forma independente por dois pesquisadores, avaliando o título e o resumo quanto à relevância usando as seguintes perguntas:

- 1) O título ou resumo descreve um estudo de intervenção experimental primário?
- 2) O título ou resumo descreve um estudo envolvendo zebrafish?
- 3) O título ou resumo descreve uma ou mais das seguintes intervenções: criopreservação ou similar usando tecido ou célula reprodutiva?

Os estudos foram excluídos se os dois revisores concordassem que o estudo não preenchia um ou mais desses critérios. Quando houve discordância entre os pesquisadores para uma das perguntas, tornando a opção por incluir/excluir o trabalho pouco clara, o estudo prosseguiu para a triagem de texto completo. Os conflitos entre

inclusão e exclusão pelos 2 revisores foram resolvidos por consenso. A triagem secundária foi realizada no texto completo dos estudos restantes por dois pesquisadores de forma independente, usando as três perguntas iniciais. Os estudos foram excluídos se ambos os revisores dissessem não a 1 das questões anteriores; conflitos foram resolvidos por consenso.

2.5. Coleta de dados

A coleta de dados foi realizada de acordo com os objetivos da revisão sistemática, onde utilizou-se uma abordagem atualizada dos principais protocolos de criopreservação de gametas, embriões e tecido gonadal utilizados no zebrafish. Portanto, os seguintes dados foram selecionados nos artigos: amostra criopreservada, método de criopreservação, solução crioprotetora, principais variáveis avaliadas e considerações do estudo. A partir dessas informações, foi possível quantificar o número de estudos utilizando congelamento lento ou vitrificação para cada amostra, a porcentagem de cada tipo de amostra criopreservada e quantificar quais foram os crioprotetores mais utilizados para cada tipo de amostra criopreservada.

3. Resultados

3.1. Resultados da busca e seleção dos estudos

A pesquisa resultou em 194 artigos científicos no PubMed, em 212 no Scopus e em 337 no Web of Science (WOS). Foram excluídos 429 artigos duplicados e 272 artigos do banco de dados por meio da análise do título, resumo e do texto, levando em consideração os fatores de idioma e do tema (artigos que não realizaram protocolos de congelamento ou vitrificação foram excluídos). Os 42 artigos remanescentes foram utilizados na revisão sistemática, além de mais 4 artigos encontrados nas referências dos artigos selecionados que foram adicionados no estudo, totalizando 46 artigos científicos (Figura 1).

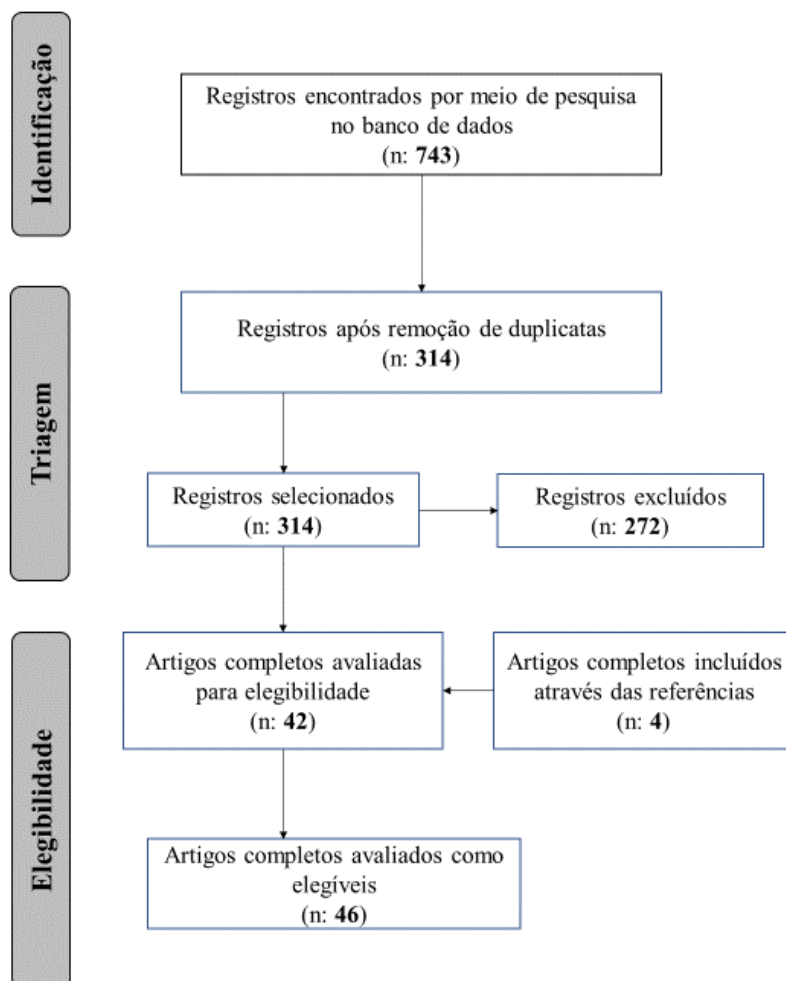


Figura 1. Esquema mostrando o fluxograma utilizado para seleção de artigos utilizados no estudo.

3.2. Características gerais dos estudos selecionados

Foram encontrados 46 estudos onde protocolos de congelamento ou vitrificação foram utilizados com o zebrafish como modelo experimental. Nesses estudos diferentes tipos de amostras foram utilizadas, sendo elas: blastômero, embrião, tecido e folículo ovariano, gônada masculina/espermatogônias, Células Germinativas Primordiais (PGCs) e sêmen. O primeiro trabalho com o uso das biotecnologias de congelamento ou vitrificação de tecidos e células reprodutivas utilizando o zebrafish foi publicado no ano de 1982 e o último no ano de 2019, ambos analisando o congelamento de sêmen da espécie. Ao analisarmos esses 37 anos de

publicações observamos um número reduzido de estudos na área nas décadas de 1980 e 1990, e um foco principal em todo período na criopreservação de sêmen e embriões (Figura 2A). Contudo, é interessante destacar que a partir do início dos anos 2000, houve um aumento significativo no número de estudos publicados na área, e uma maior diversificação no tipo de material biológico criopreservado (Figura 2A).

Ao analisar o percentual de trabalhos com foco na criopreservação de diferentes materiais biológicos de zebrafish identificamos que o sêmen foi o material mais utilizado aparecendo em quase um terço das publicações (30,6%). Outros materiais como embriões e blastômeros (ambos com 16,3%), os folículos ovarianos (12,3%), PGCs e fragmentos de tecido ovariano (ambos com 10,2%), aparecem como opções de tecidos e células a serem criopreservados. Especificamente em relação a criopreservação de testículo, visando a preservação de espermatogônias, foram encontrados apenas dois estudos representando 4,1% do total de publicações (Figura 2B). Em geral os dados mostram que além da criopreservação de materiais tradicionais como espermatozoides e embriões no início dos anos 1980, a partir dos anos 2000 outros tipos de materiais passaram a ser estudados, como é o caso dos blastômeros e tecidos mais complexos como os fragmentos de tecido ovariano e testículos (Figura 2A e B).

Ao considerarmos a técnica utilizada para criopreservação nos estudos analisados, sendo o congelamento ou/e vitrificação, identificamos que o congelamento é de maneira geral mais utilizado. Contudo, a vitrificação apresenta-se como uma alternativa nova e com potencial como método de criopreservação. Observamos que a vitrificação tem se mostrado a técnica preferida quando se trabalha com materiais mais complexos como embriões, PGCs e testículo/espermatogônias (Figura 2C).

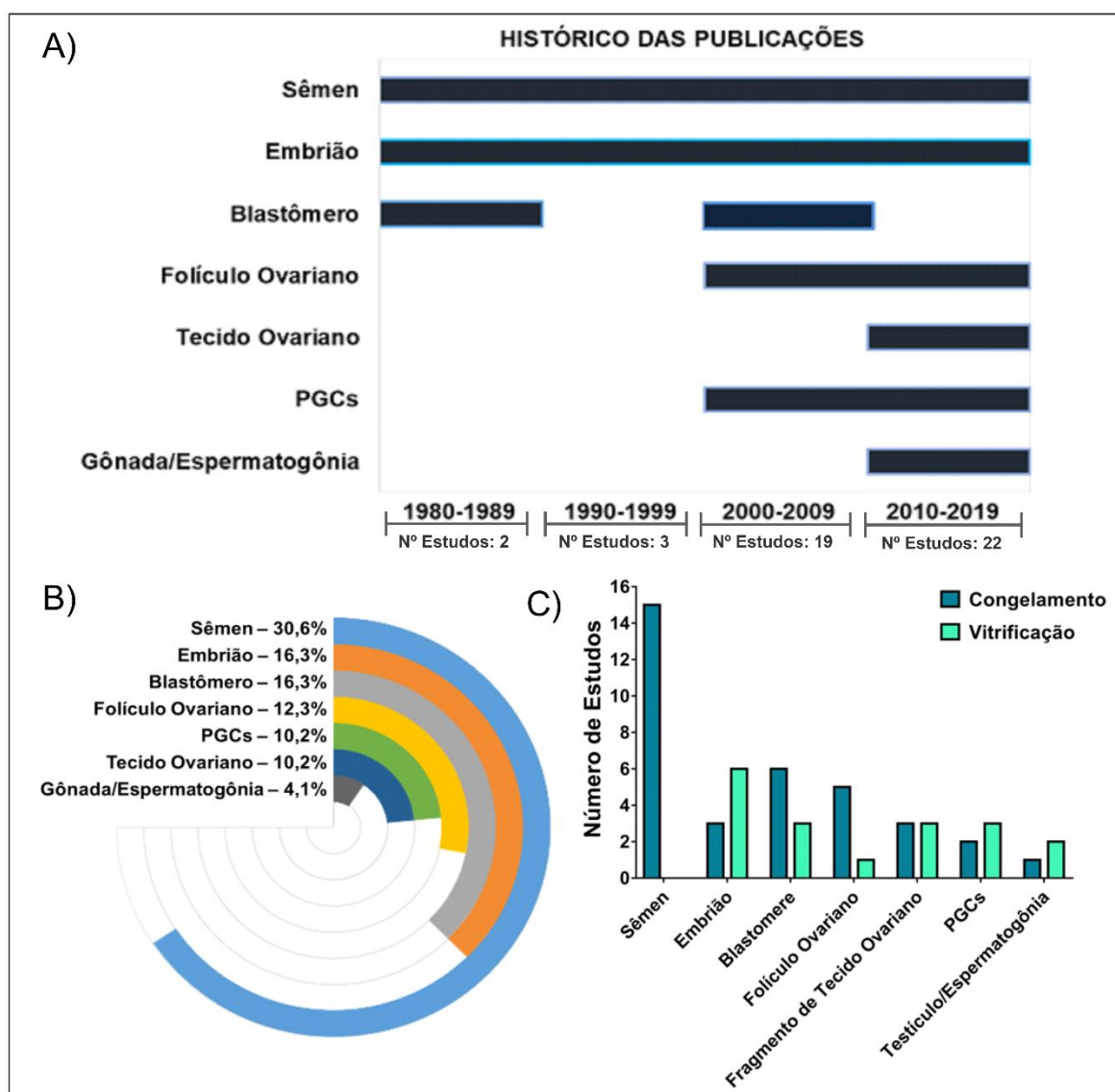


Figura 2. Panorama geral dos estudos selecionados e analisados. A) Histórico de publicações de estudos com criopreservação de diferentes materiais biológicos de zebrafish; B) Percentual de trabalhos publicados de criopreservação de diferentes amostras em zebrafish; C) Número de estudos com os métodos de congelamento e vitrificação para cada material biológico de zebrafish. PGCs = Células Germinativas Primordiais.

Quantificamos os diferentes crioprotetores permeáveis e não permeáveis utilizados em protocolos de congelamento ou vitrificação (Figura 3A e 3B). Os crioprotetores permeáveis mais utilizados foram: metanol (n=33), DMSO (n=32), etilenoglicol (n=13), propilenoglicol (n=12), glicerol (n=5), DMA (n=2), DMF (n=2), e outros (n=8). Os crioprotetores não permeáveis mais utilizados foram: sacarose (n=13), leite em pó (n=5), trealose (n=4), gema de ovo (n=4), glicose (n=3), BSA (n=2)

e outros (n=9). Quando focamos nos crioprotetores permeáveis, observamos que o metanol e o DMSO são os mais utilizados, enquanto entre os crioprotetores não permeáveis notamos que a sacarose é mais utilizada. Outro dado obtido foi de que o uso do leite em pó como crioprotetor aparece restrito a técnica de congelamento.

Com relação aos extensores utilizados, observamos que as soluções mais ricas em sais e nutrientes foram utilizadas como o HBSS (n=12) e o L-15 (n=10). Além dessas, também foram utilizados como extensores o soro fetal bovino (n=7), Ginsburg Fish Ringer (n=6), PBS (n=3), KCL (n=3), água filtrada (n=2), Albumina Sérica Bovina (n=2), e outros (n=6) (Figura 3B). É interessante notar que quando relacionamos os extensores identificados com as técnicas de criopreservação verificamos que o PBS e a solução de Ginsburg foram utilizadas apenas em testes de congelamento, enquanto a albumina sérica bovina foi utilizada apenas em testes de vitrificação.

Finalmente foi possível identificar os diferentes tipos de dispositivos que foram utilizados para criopreservar e manter as amostras. Houve uma predominância da utilização de palhetas e criotubos de diferentes tamanhos para as rotinas de criopreservação. Verificamos que alguns dispositivos foram utilizados em apenas uma das técnicas, como por exemplo alguns volumes específicos de criotubos que foram utilizados apenas no congelamento (0,5; 1,5 e 1,8 mL) ou apenas para a vitrificação (4,5 mL) (Figura 3C).

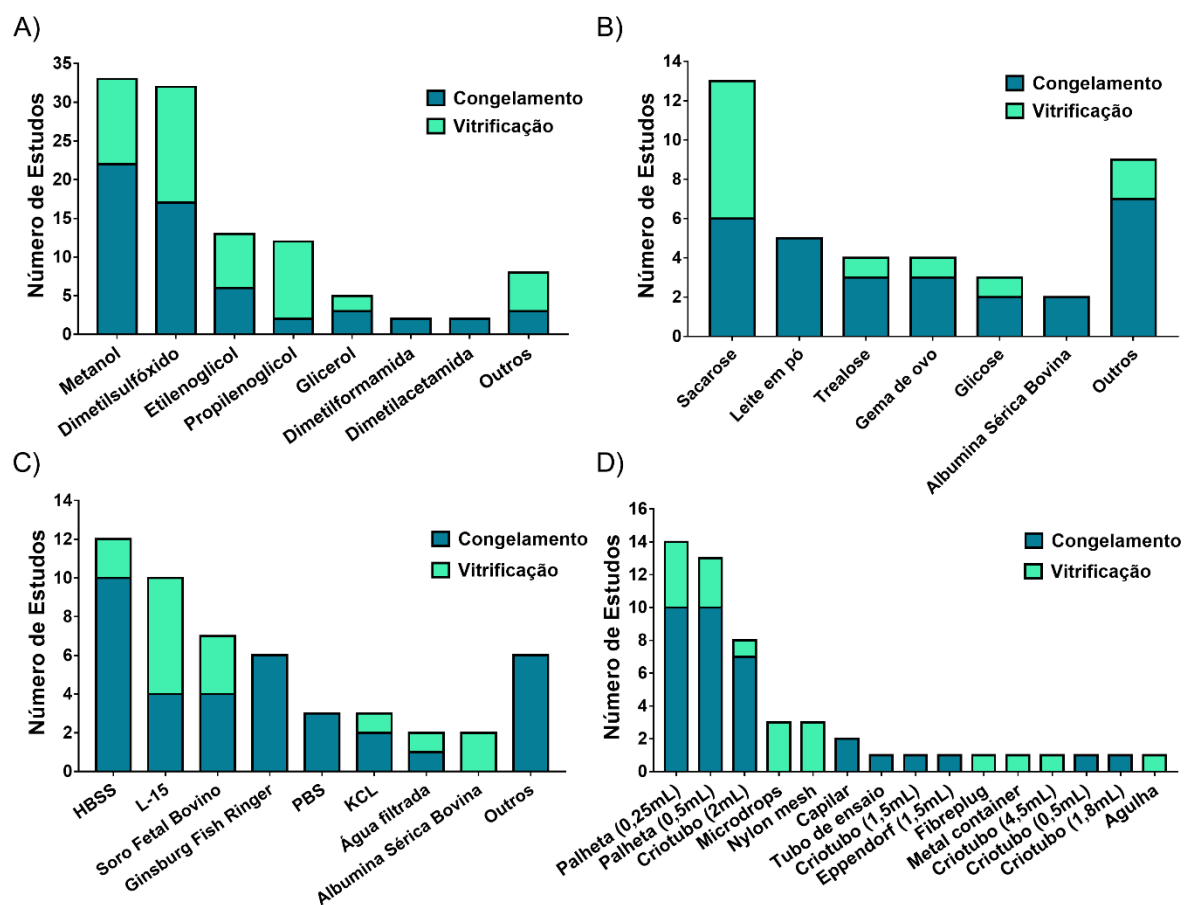


Figura 3. Quantificação dos principais componentes das técnicas de criopreservação utilizadas nos estudos analisados. A) Principais crioprotetores permeáveis utilizados em protocolos de congelamento e vitrificação em zebrafish; B) Principais crioprotetores não permeáveis utilizados em protocolos de congelamento e vitrificação em zebrafish; C) Extensores utilizados em protocolos de criopreservação em zebrafish; D) Dispositivos de criopreservação utilizados em estudos com zebrafish.

3.3. Criopreservação de células e tecidos em machos de zebrafish

A partir da seleção, foi realizada análise dos protocolos aplicados em cada artigo na tentativa de organizar grupos de informações referentes aos principais aspectos metodológicos envolvidos na criopreservação de tecidos e células de zebrafish. Inicialmente estão descritas as características gerais dos protocolos de criopreservação com sêmen e testículos/espermatogônias de zebrafish (Tabela 1). Além disso, estão demonstrados o percentual de utilização de crioprotetores, extensores, dispositivos e meio de criopreservação nos estudos com criopreservação de sêmen de zebrafish (Figura 4). E os percentuais de utilização de crioprotetores, extensores, dispositivos e meio de criopreservação utilizados nos estudos com criopreservação de gônadas e espermatogônias de zebrafish (Figura 5).

Tabela 1. Características gerais dos protocolos de criopreservação de sêmen e tecido gonadal masculino de zebrafish.

<i>Estudo</i>	<i>Amostra</i>	<i>Método</i>	<i>Meio de criopreservação</i>	<i>Taxa de resfriamento</i>	<i>Aquecimento</i>	<i>Dispositivo</i>	<i>Extensor</i>	<i>Crioprotetor</i>	<i>Análises após criopreservação</i>
Harvey <i>et al.</i> (1982)	Sêm. ¹	Cong. ¹	GS ¹ (30min) - NL ²	-16°C/min de 0°C a -35°C	Temp. Amb. ¹	Capilar	GFR ¹	MET ¹ (10%) + PM ² (15%)	Motilidade; FIV
Ransom e Zon (1999)	Sêm. ¹	Cong. ¹	GST ³ (20min) - NL ²	–	–	Capilar	GFR ¹	MET ¹ (10%) + PM ² (15%)	FIV
Morris <i>et al.</i> (2003)	Sêm. ¹	Cong. ¹	GS ¹ (30min) - NL ²	–	Temp. Amb. ¹	Criotubo (1,5mL)	GFR ¹ ; HBSS ² ; BSMIS ³	MET ¹ , GLY ³ , DMSO ⁴ , DMA ⁵ e EG ⁶ (5%; 10%; 15%; 20%)	Motilidade; FIV
Draper <i>et al.</i> (2004)	Sêm. ¹	Cong. ¹	GST ³ (20min) - NL ²	–	33°C/8-10seg	Criotubo (2mL)	GFR ¹	MET ¹ (10%) + PM ² (15%)	FIV
Yang <i>et al.</i> (2007)	Sêm. ¹	Cong. ¹	FTC ⁴ - NL ²	10°C/min; 20°C/min	40°C/5seg	Palheta (0,25mL)	HBSS ²	DMA ⁵ e DMSO ⁴ (8%); MET ¹ (4%; 8%)	Motilidade; FIV
Draper e Moens (2009)	Sêm. ¹	Cong. ¹	GST ³ (20min) - NL ²	–	33°C/10seg	Criotubo (2mL)	GFR ¹	MET ¹ (10%) + PM ² (15%)	FIV
Carmichael <i>et al.</i> (2009)	Sêm. ¹	Cong. ¹	GS ¹ (20min) - NL ²	–	33°C/10seg	Criotubo (2mL)	GFR ¹	MET ¹ (10%) + PM ² (15%)	FIV
Hagedorn <i>et al.</i> (2012)	Sêm. ¹	Cong. ¹	FTC ⁴ - NL ²	-10°C/min de 4°C a -80°C	30°C/20seg-40seg	Palheta (0,25mL)	HBSS ²	MET ¹ (8%); MET ¹ (8%) + CAT ⁷ (200 U/mL)	Motilidade; Integridade de membrana (BODIPYH/PI); Geração de EROs (DHE/SYTOXH Green)
Bai <i>et al.</i> (2013)	Sêm. ¹	Cong. ¹	FTC ⁴ - NL ²	-25°C/min a -30°C;	40°C/7seg	Palheta (0,25mL)	HBSS ²	DMSO ⁴ (8%); MET ¹ (4%)	Motilidade; Temperatura de

				5°C/min de -30°C a -80°C					nucleação; Live/Dead (SYBR14/PI)
Wang <i>et al.</i> (2015)	Sêm. ¹	Cong. ¹	FTC ⁴ - NL ²	-25°C/min a -30°C; -5°C/min de -30°C a -80°C	40°C/7seg	Palheta (0,5mL)	HBSS ²	DMSO ⁴ (8%)	Motilidade; Produção de Eros; Peroxidação lipídica; Conteúdo de ATP; Potencial de membrana mitocondrial; FIV; PCR; Western blot
Yang <i>et al.</i> (2016)	Sêm. ¹	Cong. ¹	FTC ⁴ - NL ²	-10°C/min de 4°C a -80°C	40°C/5seg	Palheta (0,25mL)	HBSS ²	MET ¹ (8%)	Motilidade; Live/Dead (SYBR14/PI); FIV
Diogo <i>et al.</i> (2018)	Sêm. ¹	Cong. ¹	FTC ⁴ - NL ² ; Ultra-freezer	-20°C/min; -66°C/min	40°C/8seg	Criotubo (2mL)	HBSS ²	DMF ⁸ (10%)	Motilidade; Live/Dead (SYBR14/PI); Apoptose (Annexin V/Dead Cell Assay); Fragmentação de DNA; FIV
Marinovic <i>et al.</i> (2018)	TG/Esp. ²	Vitr. ²	NL ²	–	25°C	Agulha – Criotubo (4,5mL)	L-15 ⁴	MET ¹ (1,5M) + PG ⁹ (1,5M); DMSO ⁴ (3M) + PG ⁹ (3M)	Viabilidade (Azul de trypan)
Matthews <i>et al.</i> (2018)	Sêm. ¹	Cong. ¹	GST ³ (20-60 min) - NL ²	-14°C/min ou -16°C/min	38°C/10-18seg	Criotubo (0,5mL e 2mL)	E400 ⁵	RMMB ¹⁰	Motilidade; FIV
Silva <i>et al.</i> (2019)	Sêm. ¹	Cong. ¹	GST ³ (20min) - NL ²	–	40°C/5seg	Palheta (0,25mL)	Grayling ⁶	MET ¹ (8%)	FIV
Marinovic <i>et al.</i> (2019)	TG/Esp. ²	Cong. ¹ / Vitr. ²	Cong.: Bicell ou Cool Cell em Ultra-freezer (90min) - NL ² ; Vitr.: NL ²	Cong.: 1°C/min; -	Cong.: 25°C/2min; Vitr.: –	Cong.: Criotubo (1,8mL); Vitr.: Agulha	Cong.: CM ⁷ ; Vitr.: L-15 supp. ⁸	Cong.: Exp. 1: DMSO ⁴ , PG ⁹ , EG ⁶ , GLY ³ (1,3M). Exp. 2: DMSO ⁴ (1,0M; 1,3M e 1,6M). Exp. 3: DMSO ⁴ (1,3M) + GLU ¹¹ ; TRE ¹² ; SUC ¹³ e FRU ¹⁴ (0,1M e 0,3M). Exp. 4: DMSO ⁴ (1,3M) + TRE ¹² (0,1M) + BSA ¹⁵ (1,5%); DMSO ⁴ (1,3M) + TRE ¹² (0,1M) + FBS ¹⁶ (1,5%); DMSO ⁴ (1,3M) + TRE ¹² (0,1M) + SM ¹⁷ (1,5%); DMSO ⁴ (1,3M) + TRE ¹² (0,1M) + EY ¹⁸ (10%). Vitr.: MET ¹ (1,5M) + PG ⁹ (4,5M); MET ¹ (1,5M) + DMSO ⁴ (5,5M); PG ⁹ (3M) + DMSO ⁴ (3M)	Viabilidade e transplante de espermatogônias; Expressão gênicas

Diogo <i>et al.</i> (2019)	Sêm. ¹	Cong. ¹	Ultra-freezer	66°C/min	40°C/8seg	Criotubo (2mL)	HBSS ²	Exp. 1: DMF ⁸ (5M; 7,5M; 10M; 12,5M e 15M). Exp. 2: DMF ⁸ (12,5M) + BSA ¹⁵ (10mg/mL); DMF ⁸ (12,5M) + EY ¹⁸ (10%); DMF ⁸ (12,5M) + GLYC ¹⁹ (30mM); DMF ⁸ (12,5M) + BIC ²⁰ (50mM); DMF ⁸ (15M) + BSA ¹⁵ (10mg/mL); DMF ⁸ (15M) + EY ¹⁸ (10%); DMF ⁸ (15M) + GLYC ¹⁹ (30mM); DMF ⁸ (15M) + BIC ²⁰ (50mM)	Motilidade; Integridade de membrana (SYBR14/PI); Malformações esqueléticas FIV;
----------------------------	-------------------	--------------------	---------------	----------	-----------	----------------	-------------------	---	---

Legendas: Amostras: ¹Sêmen (Sêm.); ²Tecido gonadal/Espermatogônia (TG/Esp.). Método: ¹Congelamento (Cong.); ²Vitrificação (Vitr.). Meio de criopreservação: ¹Gelo seco (GS); ²Nitrogênio líquido (NL); ³Gelo seco triturado (GST); ⁴Freezer de taxa controlada (FTC). Aquecimento: ¹Temperatura Ambiente (Temp. Amb.). Extensor: ¹Ginsburg Fish Ringer (GFR); ²Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS); ³BSMIS (75mM NaCl, 70mM KCl, 2mM CaCl₂, 1mM MgSO₄, e 20mM Tris, pH 8.0) ⁴Meio Leibovitz (L-15); ⁵E400 (130mM KCL, 50mM NaCl, 2mM CaCl₂, 1mM MgSO₄, 10mM Glicose e 30mM HEPES-KOH); ⁶Grayling (200mM glicose, 40mM KCl e 30mM Tris); ⁷Cryomedium (CM) (55,27mM HEPES, 375,48mM NaCl, 7,28mM KCl, 23,10mM KH₂PO₄, 3,82mM Na₂HPO₄, 3,64mM piruvato de sódio, 2,6mM CaCl₂·2H₂O e 1,4mM MgCl₂·6H₂O); ⁸L-15 supp. (L-15 + 10% FBS, 25mM HEPES e 0.5M trealose). Crioprotetores: ¹Metanol - CH₃OH (MET); ²Leite em pó (PM); ³Glicerol - C₃H₈O₃ (GLY); ⁴Dimetilsulfóxido - C₂H₆OS (DMSO); ⁵Dimetilacetamida - C₄H₉NO (DMA); ¹⁰Etilenoglicol - C₂H₆O₂ (EG); ⁷Catalase (CAT); ⁸Dimetilformamida - C₃H₇NO (DMF); ⁹Propilenoglicol - C₃H₈O₂ (PG); ¹⁰RMMB (20% Raffinose penta hidratada, 2,5% Leite em pó desnatado, 6,67% Metanol, 30mM tampão de Bicina); ¹¹Glicose - C₆H₁₂O₆ (GLU); ¹²Trealose - C₁₂H₂₂O₁₁ (TRE); ¹³Sacarose - C₁₂H₂₂O₁₁ (SUC); ¹⁴Frutose - C₆H₁₂O₆ (FRU); ¹⁵Albumina Sérica Bovina (BSA); ¹⁶Soro Fetal Bovino (FBS); ¹⁷Leite desnatado (SM); ¹⁸Gema de ovo (EY); ¹⁹Glicina (GLYC); ²⁰Bicina (BIC).

Os principais resultados observados nos artigos publicados com a criopreservação de sêmen de zebrafish estão demonstrados na Tabela 2, em que são descritos os valores apresentados nos trabalhos de motilidade (%), viabilidade (%), fertilização (%) e eclosão de larvas (%).

Tabela 2. Principais resultados observados nos artigos publicados com criopreservação de sêmen de zebrafish.

Referência	Solução Crioprotetora Escolhida	Motilidade (%)	Viabilidade (%)	Fertilização (%)	Eclosão (%)
Harvey <i>et al.</i> (1982)	GFR + MET (10%) + PM (15%)	43±12 ¹	–	51±36	–
Morris <i>et al.</i> (2003)	HBSS + DMA (10%)	11,6±5,8 ¹	–	14±10.1	–
Yang <i>et al.</i> (2007)	HBSS + MET (8%)	78±10 ¹	–	33±20	–
Draper e Moens (2009)	GFR + MET (10%) + PM (15%)	–	–	25	–
Hagedorn <i>et al.</i> (2012)	HBSS + MET (8%) + CAT (200 U/mL)	34 ¹	66 ³	–	–
Bai <i>et al.</i> (2013)	HBSS + DMSO (8%)	46,8±6,40 ²	–	–	–
Wang <i>et al.</i> (2015)	HBSS + DMSO (8%)	28±4 ²	–	62±6	~60
Yang <i>et al.</i> (2016)	HBSS + MET (8%)	28±15 ¹	45±4 ⁴	73±21	–
Diogo <i>et al.</i> (2018)	HBSS + DMF (10%)	~22 ¹	~25 ⁴	~90	~5
Matthews <i>et al.</i> (2018)	E400 + RMMB	20±13 ¹	–	68±16	–
Silva <i>et al.</i> (2019)	Grayling + MET (8%)	–	–	16±9	–
Diogo <i>et al.</i> (2019)	HBSS + BIC (50mM)	~16 ¹	~8 ⁴	~18	~8

Ginsburg Fish Ringer (GFR); Metanol (MET); Leite em pó (PM); Solução Salina Balanceada de Hank (HBSS); Catalase (CAT); Dimetilsulfóxido (DMSO); Dimetilformamida (DMF); Bicina (BIC); ¹Análise subjetiva de motilidade; ²Análise objetiva de motilidade (Software CASA); ³Citometria de fluxo (BODIPY/PI); ⁴Citometria de fluxo (SYBR14/PI). Aproximadamente (~).

Ao analisarmos os dados especificamente para amostras de sêmen criopreservadas observamos que o metanol foi utilizado em quase um terço dos protocolos (Figura 4A), sendo esse mesmo valor referente ao uso da palheta de 0,25 mL e o criotubo de 2 mL (Figura 4C). Em relação aos extensores, mais da metade dos trabalhos escolheu como extensor o HBSS (Figura 4B). Os principais meios de criopreservação foram o freezer de taxa controlada e o gelo seco triturado ou não

triturado (Figura 4D), mostrando que o congelamento lento foi utilizado em todos estudos com diferentes curvas de congelamento.

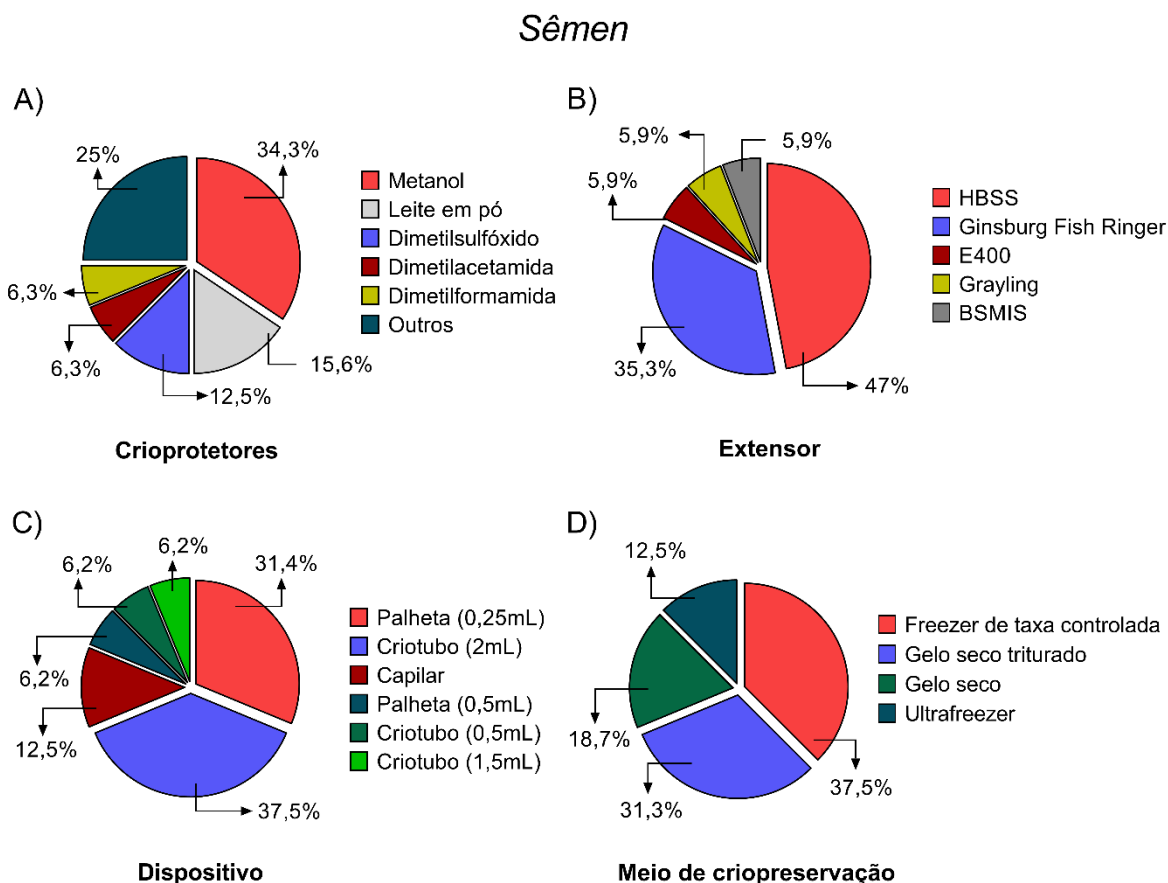


Figura 4. Dados percentuais de utilização de materiais e métodos para criopreservação de sêmen de zebrafish. A) Utilização de crioprotetores; B) Utilização de extensores; C) Utilização de dispositivos; D) Utilização de meios de criopreservação.

Ao avaliarmos os protocolos referentes a criopreservação de testículo para preservação de espermatozônias, identificamos o metanol, propilenoglicol e o DMSO como principais crioprotetores utilizados (Figura 5A). Porém, observamos que diferente do que acontece nas amostras de sêmen, foram utilizados uma quantidade diversificada de crioprotetores nos testes, resultando em 42,85% dos trabalhos classificados como “outros”, tendo em vista que são crioprotetores utilizados apenas uma vez até o momento, o que mostra que esse tipo de material biológico (testículo/espermatozônias) ainda necessita de mais estudos para definição de características metodológicas básicas no processo de criopreservação (Figura 5A). Com relação ao extensor, os mais utilizados foram o meio L-15, o meio L-15

suplementado e o meio cryomedium (Figura 5B). Os dispositivos mais utilizados são agulhas ou criotubos (Figura 5C). Com relação ao meio de criopreservação, foi utilizado o Bicell ou Cool Cell em ultrafreezer para congelamento lento e a colocação da amostra diretamente no nitrogênio líquido para a vitrificação (Figura 5D).

Tecido gonadal/Espematogônias

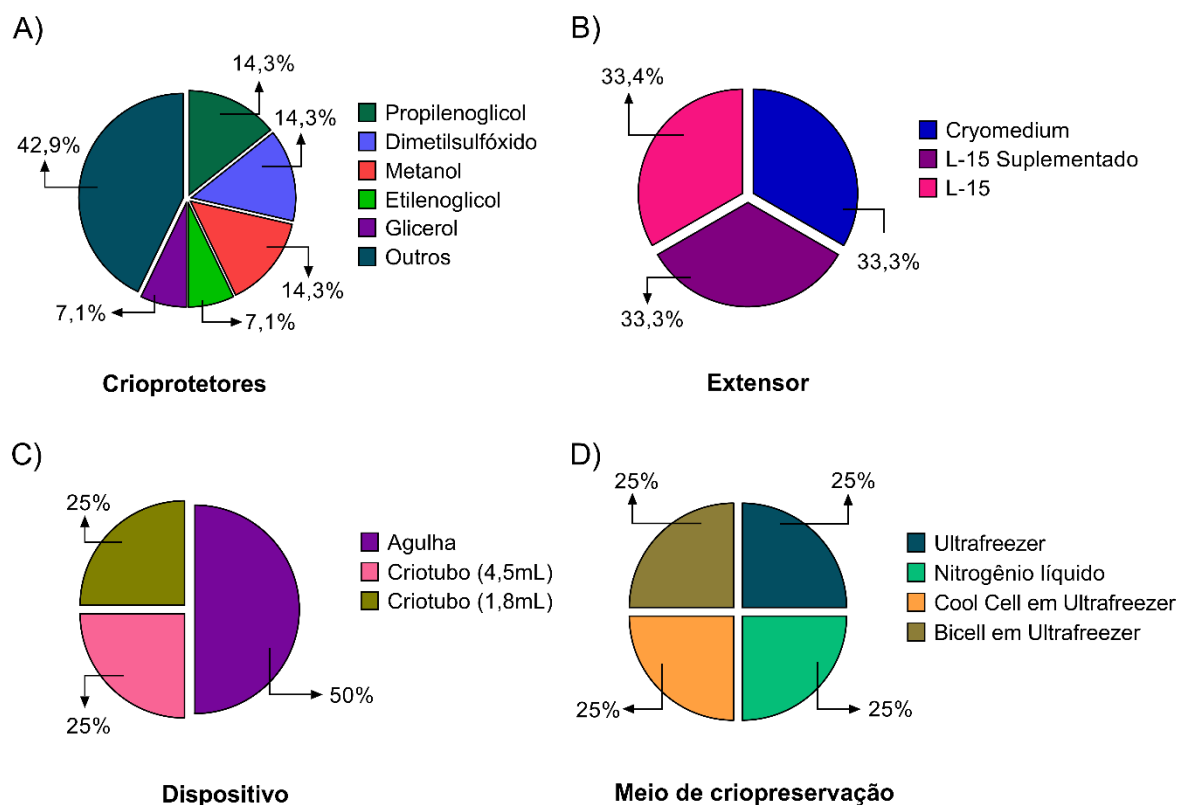


Figura 5. Dados percentuais de utilização de materiais e métodos para criopreservação de tecido gonadal e espermatogônias de zebrafish. A) Utilização de crioprotetores; B) Utilização de extensores; C) Utilização de dispositivos; D) Utilização de meios de criopreservação.

3.4. Criopreservação de células e tecidos em fêmeas de zebrafish

Na Tabela 2 estão descritas as características gerais dos protocolos de criopreservação com tecidos e células de fêmeas de zebrafish, contendo as informações dos trabalhos que avaliaram a criopreservação de tecido ovariano e folículos ovarianos. Nas Figuras 6 e 7 estão demonstrados os dados percentuais dos principais componentes dos protocolos de criopreservação de folículos ovarianos e tecidos ovarianos, respectivamente.

Tabela 3. Características gerais dos protocolos de criopreservação em tecido e folículos ovarianos em fêmeas de zebrafish.

<i>Estudo</i>	<i>Amostr a</i>	<i>Métod o</i>	<i>Meio de criopreser vação</i>	<i>Taxa de resfriamento</i>	<i>Aqueci mento</i>	<i>Dispositi vo</i>	<i>Extens or</i>	<i>Crioprotetor</i>	<i>Análises após criopreservação</i>
Guan <i>et al.</i> (2008)	FO ¹	Cong. ¹	FTC ¹ - NL ²	-2°C/min de 20°C a -10°C; -0,3°C/min de 10°C a -40°C; -10°C/min de 40°C a -80°C; -50°C/min de 80°C a -160°C	27°C	Palheta (0,5mL)	KCl Buffer ¹ ; L-15 ²	MET ¹ (4M)	Viabilidade (Azul de tripan); Viabilidade (Ensaio de ATP)
Zhang <i>et al.</i> (2008)	FO ¹	Cong. ¹	FTC ¹ - NL ²	-2°C/min de 20°C a -7,5°C; -0,5°C/min de 7,5°C a -40°C; -10°C/min de 40°C a -80°C	27°C/10 seg.	Palheta (0,5mL)	HBSS ³	DMSO ² e MET ¹ (2M)	Atividade das enzimas Catepsina D, L e B; Viabilidade (Azul de tripan)
Tsai <i>et al.</i> (2009)	FO ¹	Cong. ¹	FTC ¹ - NL ²	-2°C/min de 20°C a -10°C; -0,3; -0,5; -1; -2; -4; -8; -16°C/min de 10°C a -40°C; -10°C/min de 40°C a -80°C	28°C	Palheta (0,25mL)	KCl Buffer ¹ ; L-15 ²	MET ¹ (4M); DMSO ² (3M)	Viabilidade (Azul de tripan); Live/Dead (FDA/IP); Relação ADP/ATP
Guan <i>et al.</i> (2010)	FO ¹	Vitr. ²	NL ²	–	26°C	Palheta (0,25mL)	KCl Buffer ¹ ; L-15 ²	DMSO ² (3M) + MET ¹ (2M) + PG ³ (2M); DMSO ² (2,5M) + MET ¹ (1M) + PG ³ (0,75M)	Viabilidade (Azul de tripan)
Tsai <i>et al.</i> (2010)	FO ¹	Cong. ¹	FTC ¹ - NL ²	2°C/min de 20°C a -12,5°C; -4°C/min de -12,5°C a -40°C; -10°C/min de -40°C a -80°C	28°C	Palheta (0,25mL)	KCl Buffer ¹	MET ¹ (4M)	Viabilidade (Azul de tripan); Desenvolvimento dos oócitos pós aquecimento; Morfometria dos oócitos
Zampolla <i>et al.</i> (2011)	FTO ²	Cong. ¹	FTC ¹ - NL ²	2°C/min de 20°C a -12,5°C; -4°C/min de -12,5°C a -40°C; -10°C/min de -40°C a -80°C	28°C	Palheta (0,5mL)	HBSS ³	MET ¹ (1M; 4M)	Viabilidade (Azul de tripan); Live/Dead (FDA/PI); Nível de ATP; Localização de

									citoesqueletos e proteínas mitocondriais
Zampolla <i>et al.</i> (2012)	FO ¹	Cong. ¹	FTC ¹ NL ²	-2°C/min de 20°C a -12,5°C; -0,3°C/min de 12,5°C a -40°C; -10°C/min de 40°C a -80°C; -50°C/min de 80°C a -160°C	27°C	Palheta (0,5mL)	FBS ⁴ (10%)	MET ¹ (1M; 2M; 4M)	Viabilidade (Azul de tripan); Nível de ATP
Godoy <i>et al.</i> (2013)	FTO ²	Vitr. ²	NL ²	–	28°C	Palheta (0,25mL); Fiber plugs	L-15 ²	MET ¹ e ETH ⁴ (8M; 8,5M; 9M; 9,5M; 10M; 10,5M; 11M); DMSO ² (3M; 3,5M; 4M; 4,5M; 5M; 5,5M; 6M); PG ³ (2,5M; 3M; 3,5M; 4M; 4,5M; 5M; 5,5M); EG ⁵ (4M; 4,5M; 5M; 5,5M; 6M; 6,5M; 7M); SUC ⁶ (0,25M; 0,5M); GLU ⁷ (0,25M; 0,5M)	Viabilidade (Azul de tripan); Nível de ATP citoplasmático; Integridade mitocondrial; Atividade mitocondrial
Marques <i>et al.</i> (2015)	FTO ²	Vitr. ²	NL ²	–	28°C/30 seg.	Metal container	L-15 ²	MET ¹ (1,5M) + PG ³ (4,5M); MET ¹ (1,5M) + DMSO ² (5,5M); MET ¹ (1,5M) + PG ³ (4,5M) + SUC ⁶ (0,5M); MET ¹ (1,5M) + DMSO ² (5,5M) + SUC ⁶ (0,5M)	Live/Dead (FDA/PI); Maturação in vitro dos oócitos; Integridade morfológica (Histologia)
Anil <i>et al.</i> (2018)	FTO ²	Cong. ¹	FTC ¹ NL ²	-2°C/min de 20°C a -7,5°C; -4°C/min de -7,5°C a -40°C; -10°C/min de 40°C a -80°C	28°C	Palheta (0,5mL)	L-15 ² + FBS ⁴ (20%)	MET ¹ (2M)	Morfometria de oócitos; Viabilidade (Azul de tripan)
Marques <i>et al.</i> (2019)	FTO ²	Cong. ¹ / Vitr. ²	Cong.: Bicell em ultrafreezer – NL ² ; Vitr.: NL ²	Cong.: -1°C/min; Vitr.: –	28°C/30 seg.	Criotubo (2mL)	L-15 ²	Cong.: MET ¹ (2M) + SUC ⁶ (0,1M); MET ¹ (2M) + SUC ⁶ (0,1M) + EY ⁸ (10%); MET ¹ (2M) + TRE ⁹ (0,1M); MET ¹ (2M) + TRE ⁹ (0,1M) + EY ⁸ (10%); DMSO ² (2M) + SUC ⁶ (0,1M); DMSO ² (2M) + SUC ⁶ (0,1M) + EY ⁸ (10%); DMSO ² (2M) + TRE ⁹ (0,1M); DMSO ² (2M) + TRE ⁹ (0,1M) + EY ⁸ (10%).	Integridade de membrana (Azul de tripan); Viabilidade (Histologia); Microscopia eletrônica de transmissão (TEM); Geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) por DCFH; Capacidade antioxidante total por FRAP (Redutor férrico / poder

								Vitr.: MET ¹ (1,5M) + DMSO ² (5,5M) + SUC ⁶ (0,5M); MET ¹ (1,5M) + DMSO ² (5,5M) + SUC ⁶ (0,5M) + EY ⁸ (10%); MET ¹ (1,5M) + DMSO ² (5,5M) + TRE ⁹ (0,5M); MET ¹ (1,5M) + DMSO ² (5,5M) + TRE ⁹ (0,5M) + EY ⁸ (10%).	antioxidante); Atividade mitocondrial (MTT); Danos ao DNA (Ensaio cometa)
--	--	--	--	--	--	--	--	--	---

Legendas: *Amostra:* ¹Foliculo Ovariano (FO); ²Fragmento de Tecido Ovariano (FTO). *Método:* ¹Congelamento (Cong.); ²Vitrificação (Vitr.). *Meio de criopreservação:* ¹Freezer de taxa controlada (FTC); ²Nitrogênio líquido (NL). *Extensor:* ¹KCl buffer; ²Meio Leibovitz (L-15); ³Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS); ³Phosphate Buffered Saline (PBS); ⁴Soro Fetal Bovino (FBS). *Crioprotetores:* ¹Metanol - CH₃OH (MET); ²Dimetilsulfóxido - C₂H₆OS (DMSO); ³Propilenoglicol - C₃H₈O₂ (PG); ⁴Etanol - C₂H₆O (ETH); ⁵Etileneglicol - C₂H₆O₂ (EG); ⁶Sacarose - C₁₂H₂₂O₁₁ (SUC); ⁷Glicose - C₆H₁₂O₆ (GLU); ⁸Gema de ovo (EY); ⁹Trealose - C₁₂H₂₂O₁₁ (TRE).

A viabilidade de oócitos após o congelamento/descongelamento ou vitrificação/aquecimento nos processos de criopreservação de folículos ovarianos ou de fragmentos de tecido ovariano estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4. Viabilidade de oócitos após criopreservação de folículos ovarianos e fragmentos de tecido ovariano de zebrafish.

Referência	Método	Solução Crioprotetora Escolhida	Viabilidade TB (%)	Viabilidade FDA/PI (%)
<i>Folículo Ovariano</i>				
Guan <i>et al.</i> (2008)	Cong.	KCl Buffer + MET (4M)	88±1,7	–
Zhang <i>et al.</i> (2008)	Cong.	HBSS + DMSO (2M)	14,9±2,6	–
Tsai <i>et al.</i> (2009)	Cong.	KCl Buffer + MET (4M)	69,4±2,2	54,3±3,7
Guan <i>et al.</i> (2010)	Vitr.	KCl Buffer + DMSO (3M) + MET (2M) + PG (2M)	~80	–
Tsai <i>et al.</i> (2010)	Cong.	KCl Buffer + MET (4M)	20,6±3,1	–
Zampolla <i>et al.</i> (2012)	Cong.	FBS (10%) + MET (2M)	70,2±4,2	–
<i>Fragmento de tecido ovariano</i>				
Zampolla <i>et al.</i> (2011)	Cong.	HBSS+ MET (1M)	~90	~90
Godoy <i>et al.</i> (2013)	Vitr.	L-15 + MET (1.5M) + PG (4.5M)	59,9±18,4	–
Marques <i>et al.</i> (2015)	Vitr.	L-15 + MET (1.5M) + PG (4.5M)	–	76,8±2,3
Anil <i>et al.</i> (2018)	Cong.	L-15 + FBS (20%) + MET (2M)	~10	–
Marques <i>et al.</i> (2019)	Vitr.	L-15 + MET (1.5M) + DMSO (5.5M) + SUC (0.5M) + EY (10%)	56,3±19,1	–

Metanol (MET); Solução Salina Balanceada de Hank (HBSS); Dimetilsulfóxido (DMSO); Propilenoglicol (PG); Soro Fetal Bovino (FBS); Meio Leibovitz (L-15); Sacarose (SUC); Gema de ovo (EY); Congelamento (Cong.); Vitrificação (Vitr.); Tripán Blue (TB); Diacetato de fluoresceína (FDA); Iodeto de propídio (PI). Aproximadamente (~).

Para a criopreservação de folículo ovariano de zebrafish a grande maioria dos trabalhos utilizou o metanol (60%) como crioprotetor (Figura 6A), já em relação aos extensores, o mais utilizado foi o tampão KCl com 44,5% (Figura 6B). Em relação aos dispositivos utilizados observamos que apenas as palhetas foram testadas (Figura 6C), e em relação ao meio de criopreservação o freezer de taxa controlada foi o mais utilizado (Figura 6D).

Folículo Ovariano

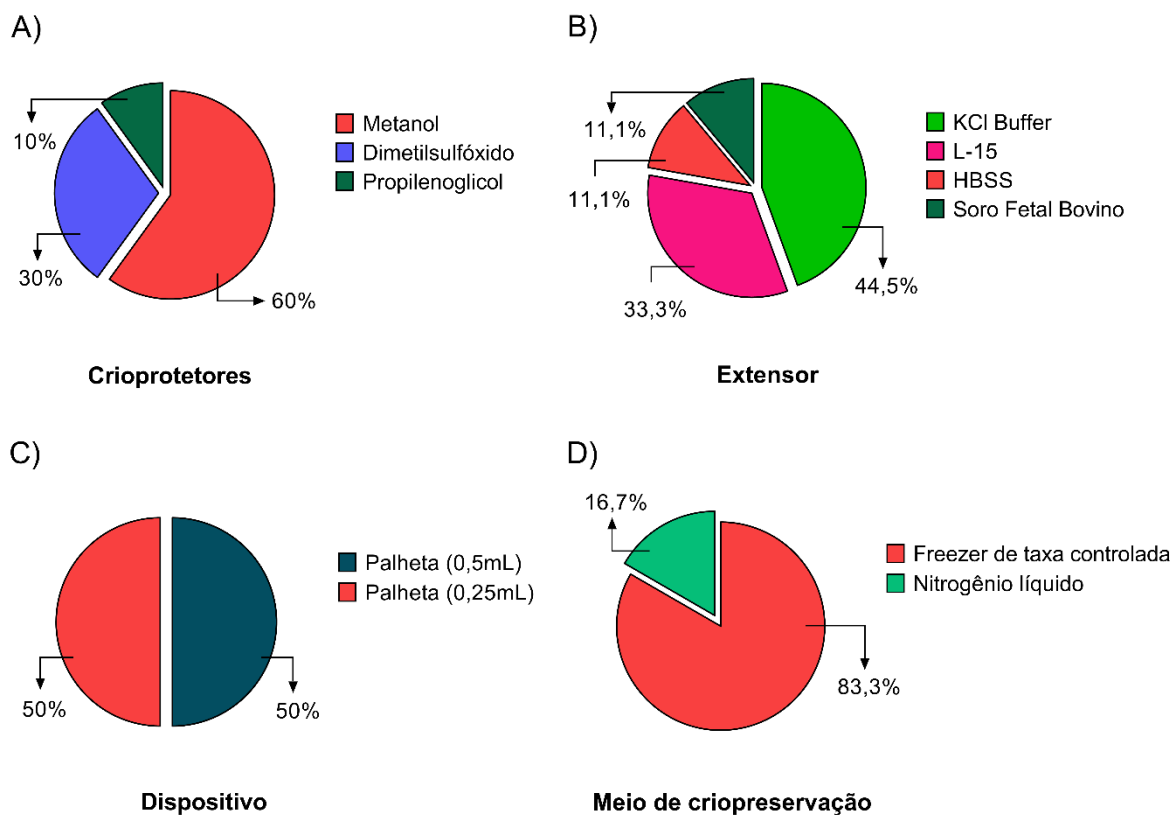


Figura 6. Dados percentuais de utilização de materiais e métodos para criopreservação de folículos ovarianos de zebrafish. A) Utilização de crioprotetores (%); B) Utilização de extensores (%); C) Utilização de dispositivos (%); D) Utilização de meios de criopreservação (%).

Quando analisamos os dados referentes a criopreservação de fragmentos de tecido ovariano observamos uma abordagem diferente dos estudos com folículos ovarianos já dissociados, pois o meio L-15 foi o mais utilizado, com 66,6% (Figura 7B). Com relação aos crioprotetores, observamos uma gama maior de compostos utilizados, sendo os mais utilizados o metanol como crioprotetor permeável e a sacarose como crioprotetor não permeável (Figura 7A). Uma variedade de dispositivos também foi testada para a criopreservação de fragmentos de tecido ovariano, sendo as palhetas novamente os mais utilizados (Figura 7C). Podemos observar que as técnicas de congelamento e vitrificação foram igualmente testadas, sendo que para congelamento foi utilizado como meio de criopreservação o freezer de taxa controlada preferencialmente (Figura 7D).

Fragmento de Tecido Ovariano

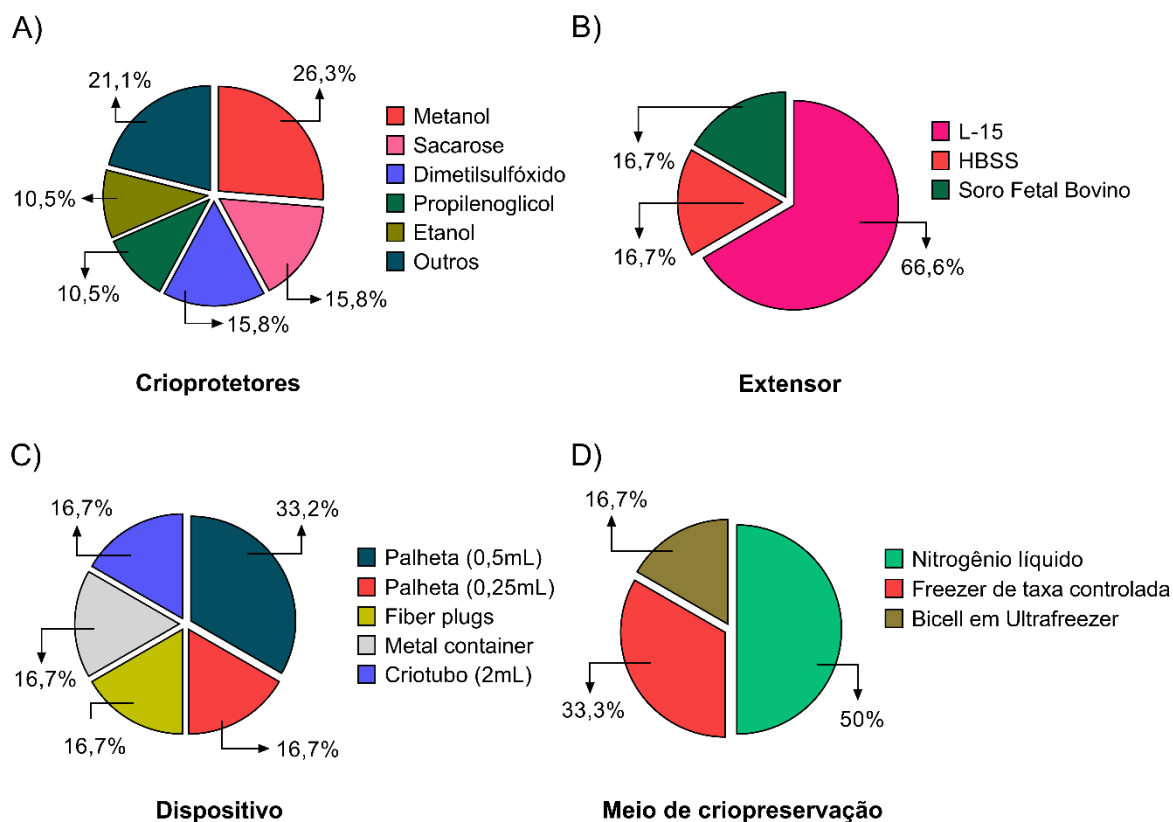


Figura 7. Dados percentuais de utilização de materiais e métodos para criopreservação de fragmentos de tecido ovariano de zebrafish. A) Utilização de crioprotetores; B) Utilização de extensores; C) Utilização de dispositivos; D) Utilização de meios de criopreservação.

3.5. Criopreservação de embriões e células primordiais de zebrafish

Nesse tópico estão descritas as características gerais dos protocolos de criopreservação de embriões, blastômeros e PGCs de zebrafish (Tabela 3). Podemos observar nas Figuras 8, 9 e 10, os dados percentuais de utilização de crioprotetores, extensores, dispositivos e meios de criopreservação nos estudos com criopreservação de embriões, blastômeros e PGCs de zebrafish, respectivamente.

Tabela 5. Características gerais dos protocolos de criopreservação de embriões, blastômeros e células germinativas primordiais (PGCs) de zebrafish.

<i>Estudo</i>	<i>Amostra</i>	<i>Método</i>	<i>Meio de criopreservação</i>	<i>Taxa de resfriamento</i>	<i>Aquecimento</i>	<i>Dispositivo</i>	<i>Extensor</i>	<i>Crioprotetor</i>	<i>Análises após criopreservação</i>
Harvey (1983)	Embr. ¹ ; Blast. ²	Cong. ¹	Gelo (2min) – AR ¹ (15min) – NL ²	–	Temp. Amb. ¹	Tubo de ensaio	Medium 199 ¹	GLY ¹ e DMSO ² (2M; 2,8M)	Viabilidade (Azul de tripan); Desenvolvimento embrionário
Zhang <i>et al.</i> (1993)	Embr. ¹	Cong. ¹	FTC ³ – NL ²	0,1°C/min; 0,75°C/min	25°C	Palheta (0,5mL)	FW ²	MET ³ (1M; 2M; 3M; 4M); DMSO ² (2M); ETA ⁴ (2M)	Desenvolvimento embrionário; Taxa de eclosão
Zhang e Rawson (1996)	Embr. ¹	Vitr. ²	NL ²	–	25°C/5seg.	Palheta (0,25mL)	FW ²	DMSO ² (2M) + PD ⁵ (3M) + PEG ⁶ (0,5M); MET ³ (2M) + PD ⁵ (5M) + PEG ⁶ (0,15M); BD ⁷ (2M) + PD ⁵ (3M) + PEG ⁶ (0,15M)	Toxicidade das soluções; Respostas osmóticas; Viabilidade morfológica
Janik <i>et al.</i> (2000)	Embr. ¹	Vitr. ²	VNL ⁴ (3min) – NL ²	–	22-23°C/10seg.	Palheta (0,25mL)	–	PG ⁸ (2M; 3M; 4M; 6M; 8M)	Morfologia celular dos embriões
Robles <i>et al.</i> (2004)	Embr. ¹	Vitr. ²	NL ²	–	0°C/7seg.	Palheta (0,5mL)	Ringer ³	DMSO ² (5M) + EG ⁹ (1M) + MET ³ (2M) + SUC ¹⁰ (10%)	Taxa de eclosão; Atividade enzimática de LDH e G6PDH
Kopeika <i>et al.</i> (2005)	Blast. ²	Cong. ¹	-	-5°C/min de 20°C a 0°C; -1°C/min de 0°C a -40°C	Temp. Amb. ¹	Microtubo (1,5mL)	PBS ⁴ + FBS ⁵ (10%)	DMSO ² (1,4M)	Viabilidade (Azul de tripan); Frequências de mutação
Martinez <i>et al.</i> (2005)	Embr. ¹	Vitr. ²	NL ²	–	25°C/7seg.	Palheta (0,5mL)	Ringer ³	DMSO ² (5M) + EG ⁹ (1M) + MET ³ (2M) + SUC ¹⁰ (10%)	Live/Dead (SYBR14/IP)
Cardona-Costa e García-Ximénez (2007)	Blast. ²	Vitr. ²	NL ²	–	25°C	Microdrop	HBSS ⁶ + FBS ⁵ (20%)	DMSO ² , GLY ¹ , PG ⁸ e EG ⁹ (5M)	Números totais de blastômeros intactos; Viabilidade (Azul de tripan)
Lin <i>et al.</i> (2009a)	Blast. ²	Cong. ¹	FTC ³ – NL ²	-5°C/min de 22°C a -6°C; -0,3°C/min de -	28°C/15seg.	Palheta (0,25mL)	PBS ⁴ +	MET ³ , PG ⁸ , EG ⁹ (2M); DMSO ² (1,5M); SUC ¹⁰ , GLU ¹¹ e TRE ¹² (0,05M; 0,1M; 0,2M)	Viabilidade (Azul de tripan)

				6°C a -40°C; - 2°C/min de - 40°C a -80°C			FBS ⁵ (10%)		
Martínez- Páramo <i>et al.</i> (2009)	Embr. ¹ ; Blast. ²	Cong. ¹ / Vitr. ²	FTC ³ - NL ² / NL ²	–	25°C/7s eg.	Palheta (0,5mL)	–	Embriões Vitrif.: DMSO ² (5M) + MET ³ (2M) + EG ⁹ (1M) + SUC ¹⁰ (10%); Blastômero Cong.: DMSO ² (2M); DMSO ² (2M) + AFP ¹³ (10mg/mL)	Viabilidade dos blastômeros e embriões
Lin <i>et al.</i> (2009b)	Blast. ²	Cong. ¹	FTC ³ - NL ²	-5°C/min de 22°C a -6°C; - 0,3°C/min de - 6°C a -40°C; - 2°C/min de - 40°C a -80°C	28°C/15 seg.	Palheta (0,25mL)	–	DMSO ² (1,5M) + SUC ¹⁰ (0,1M)	Expressão dos genes Pax2a, Pax2b, pax5 e Pax8
Lin <i>et al.</i> (2009c)	Blast. ²	Cong. ¹	FTC ³ - NL ²	-1°C/min a - 6°C; - 0.3°C/min de - 6°C a -40°C; - 2°C/min de - 40°C a -80°C	28°C/15 seg.	Palheta (0,25mL)	PBS ⁴ + FBS ⁵ (10%)	DMSO ² (1,5M) + SUC ¹⁰ (0,1M)	Expressão gênica de genes de manutenção para uso em estudos de criopreservação
Cardona -Costa <i>et al.</i> (2009)	Blast. ²	Vitr. ²	NL ²	–	25°C	Microdr op	HBSS ⁶ + FBS ⁵ (10%)	DMSO ² (5M)	Sobrevivência dos blastômeros; Número total de blastômeros recuperados por embrião doador; Transplante
Higaki <i>et al.</i> (2009)	PGCs ³	Vitr. ²	NL ²	–	–	Nylon mesh	BSA ⁷ (0,7%)	EG ⁹ , DMSO ² , PG ⁸ e BG ¹⁴ (6M); EG ⁹ (3M) + PG ⁸ (3M); DMSO ² (3M) + PG ⁸ (3M); EG ⁹ (3M) + BG ¹⁴ (3M); DMSO ² (3M) + BG ¹⁴ (3M)	Recuperação de PGCs vivos em embriões criopreservados
Higaki <i>et al.</i> (2010)	PGCs ³	Vitr. ²	NL ²	–	–	Nylon mesh	BSA ⁷ (0,7%)	EG ⁹ , MET ³ , DMSO ² , GLY ¹ , PG ⁸ e BG ¹⁴ (5M) + SUC ¹⁰ (0,5M)	Viabilidade de células embrionárias e PGCs
Riesco <i>et al.</i> (2012)	PGCs ³	Cong. ¹ / Vitr. ²	Cong.: VNL ⁴ - NL ² / Vitr.: NL ²	–	Cong.: 25°C/20 seg / Vitr.: 63°C/6s eg	Criotubo ; Palheta (0,5mL); Microdr op	–	DMSO ² (5M) + EG ⁹ (1M) + PVP ¹⁵ (4%); DMSO ² (5M) + EG ⁹ (1M) + PVP ¹⁵ (4%) + AFP ¹³ (10mg/mL); DMSO ² (5M) + EG ⁹ (1M) + PVP ¹⁵ (4%) + AFP ¹³ (20mg/mL)	Viabilidade (Azul de tripan); Fragmentação de DNA (Ensaio cometa)

Higaki <i>et al.</i> (2013)	Embr. ¹ ; PGCs ³	Vitr. ²	NL ²	–	–	Nylon mesh	FBS ⁵ (0,7%)	EG ⁹ , DMSO ² , PG ⁸ (5M) + SUC ¹⁰ (0,5M); EG ⁹ (3M) + DMSO ² (2M) + SUC ¹⁰ (0,5M); EG ⁹ (3M) + PG ⁸ (2M) + SUC ¹⁰ (0,5M); DMSO ² (3M) + EG ⁹ (2M) + SUC ¹⁰ (0,5M); DMSO ² (3M) + PG ⁸ (2M) + SUC ¹⁰ (0,5M); PG ⁸ (3M) + DMSO ² (2M) + SUC ¹⁰ (0,5M); PG ⁸ (3M) + EG ⁹ (2M) + SUC ¹⁰ (0,5M)	Viabilidade (Azul de tripan); Fertilização por transplante; Capacidade de diferenciar PGCs recuperados de embriões vitrificados após transferência para receptores
Riesco e Robles (2013)	PGCs ³	Cong . ¹	VNL ⁴ (20min) - NL ²	–	–	Palheta (0,5mL)	HBSS ⁶	DMSO ² (5M) + EG ⁹ (1M) + PVP ¹⁵ (4%)	Danos ao DNA; Expressão gênica; Metilação de DNA

Legendas: Amostras: ¹Embriões (Embr.); ²Blastômeros (Blast.); ³Células Germinativas Primordiais (PGCs). *Método:* ¹Congelamento (Cong.); ²Vitrificação (Vitr.). *Meio de criopreservação:* ¹Alcool resfriado (AR); ²Nitrogênio líquido (NL); ³Freezer de taxa controlada (FTC); ⁴Vapor de nitrogênio líquido (VNL) . *Extensor:* ¹Medium 199 (10x concentrado, com HBSS e L-glutamina 10 mL; Hepes buffer (0,25 M) 10 mL; Sulfato de canamicina (5 mg/mL) 1,0 mL; Piruvato de sódio (1 M) 0,1 mL; NaHCO (8,8% w/v) 1,0 mL; Fetal calf serum 15 mL; Água destilada 77,9 mL); ²Água filtrada (FW); ³Ringer (40,23 mM KCl, 111,22 mM NaCl, 2,7 mM CaCl₂, 2,38 mM NaHCO₃); ⁴Phosphate Buffered Saline (PBS); ⁵Soro Fetal Bovino (FBS); ⁶Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS); ⁶Albumina Sérica Bovina (BSA). *Crioprotetores:* ¹Glicerol - C₃H₈O₃ (GLY); ²Dimetilsulfóxido - C₂H₆OS (DMSO); ³Metanol - CH₃OH (MET); ⁴Etanodiol - C₂H₆O₂ (ETA); ⁵1,3-Propanodiol - C₃H₈O₂ (PD); ⁶Polietilenoglicol - C_{2n}H_{4n+2}O_{n+1} (PEG); ⁷1,4-Butanodiol - C₄H₁₀O₂ (BD); ⁸Propilenoglicol - C₃H₈O₂ (PG); ⁹Etilenoglicol - C₂H₆O₂ (EG); ¹⁰Sacarose - C₁₂H₂₂O₁₁ (SUC); ¹¹Glicose - C₆H₁₂O₆ (GLU); ¹²Trealose - C₁₂H₂₂O₁₁ (TRE); ¹³Antifreeze Protein (AFP); ¹⁴Butilenoglicol - C₄H₁₀O₂ (BG); ¹⁵Polivinilpirrolidona - (C₆H₉NO)_n (PVP).

A viabilidade celular após o congelamento/descongelamento ou vitrificação/aquecimento nos processos de criopreservação de células germinativas primordiais, blastômeros e embriões estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6. Viabilidade celular após criopreservação de células germinativas primordiais (PGCs), blastômeros e embriões de zebrafish.

Referência	Método	Solução Crioprotetora Escolhida	Viabilidade (%)
<i>Embrião</i>			
Zhang e Rawson (1996)	Vitr.	FW + BD (2M) + PD (3M) + PEG (0,15M)	~32 ¹
Martínez-Páramo <i>et al.</i> (2009)	Vitr.	DMSO (5M) + MET (2M) + EG (1M) + SUC (10%)	~51 ¹
<i>Blastômeros</i>			
Kopeika <i>et al.</i> (2005)	Cong.	PBS + FBS (10%) + DMSO (1,4M)	25,2±4,3 ²
Cardona-Costa e García-Ximénez (2007)	Vitr.	HBSS + FBS (20%) + DMSO (5M)	~93,4 ²
Lin <i>et al.</i> (2009a)	Cong.	PBS + FBS (10%) + DMSO (1,5M) + SUC (0,1M)	70,2±3,2 ²
Cardona-Costa <i>et al.</i> (2009)	Vitr.	HBSS + FBS (10%) + DMSO (5M)	~90% ²
Martínez-Páramo <i>et al.</i> (2009)	Cong.	DMSO (2M) + AFP (10mg/mL)	54,2±0,97 ³
<i>Células Germinativas Primordiais - PGCs</i>			
Higaki <i>et al.</i> (2009)	Vitr.	BSA (0,7%) + EG (3M) + PG (3M)	~25 ²
Higaki <i>et al.</i> (2010)	Vitr.	BSA (0,7%) + EG (5M) + SUC (0,5M)	~40 ²
Riesco <i>et al.</i> (2012)	Cong.	DMSO (5M) + EG (1M) + PVP (4%)	92,3±13,9 ²
Higaki <i>et al.</i> (2013)	Vitr.	FBS (0,7%) + EG (3M) + DMSO (2M) + SUC (0,5M)	~81 ²

Congelamento (Cong.); Vitrificação (Vitr.); Água filtrada (FW); Metanol (MET); 1,4-Butanodiol (BD); 1,3-Propanodiol (PD); Polietilenoglicol (PEG); Dimetilsulfóxido (DMSO); Etilenoglicol (EG); Sacarose (SUC); Phosphate Buffered Saline (PBS); Soro Fetal Bovino (FBS); Solução Salina Balanceada de Hank (HBSS); Antifreeze Protein (AFP); Albumina Sérica Bovina (BSA); Propilenoglicol (PG); Polivinilpirrolidona (PVP). Viabilidade (%) = ¹Sobrevivência morfológica; ²Azul de tripan; ³Diacetato de fluoresceína - FDA/Iodeto de propídio -PI. Aproximadamente (-).

Ao analisar os dados dos estudos de criopreservação de embriões de zebrafish inicialmente observamos grande variedade de extensores, crioprotetores, dispositivos e técnicas já utilizadas (Figura 8). Em relação aos crioprotetores o DMSO foi o mais utilizado dentre todos crioprotetores, enquanto a sacarose foi o crioprotetor não permeável mais utilizado (Figura 8A). Dentre os extensores, a água filtrada e a solução de Ringer foram testados em mais de 60% dos estudos (Figura 8B). Com relação aos dispositivos de criopreservação, a palheta de 0,5mL foi utilizada em metade dos

testes, seguida pela palheta de 0,25mL (Figura 8C). Quanto ao meio de criopreservação, observamos que a maior parte dos estudos utilizou o nitrogênio líquido em testes de vitrificação, enquanto o congelamento lento foi realizado em freezer de taxa controlada preferencialmente, seguido de álcool refrigerado, vapor de nitrogênio líquido e gelo (Figura 8D).

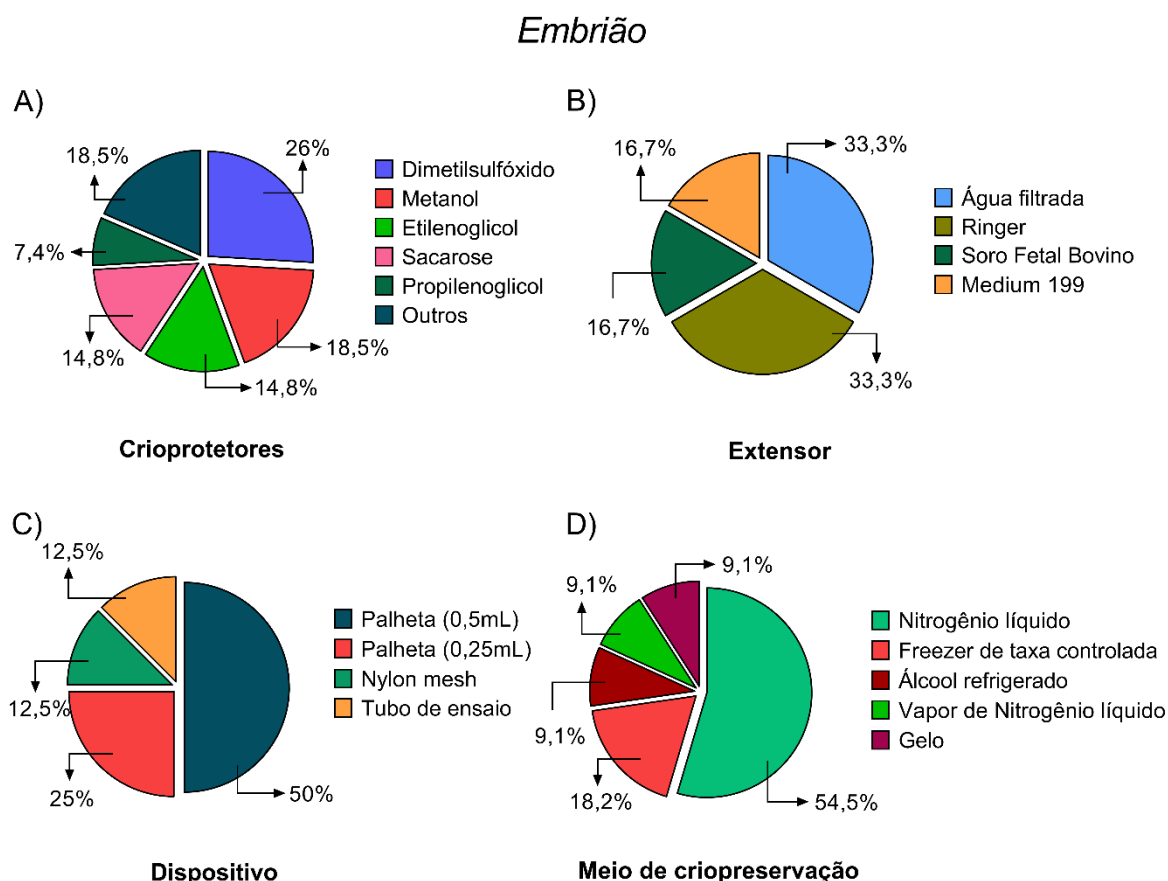


Figura 8. Dados percentuais de utilização de materiais e métodos para criopreservação de embriões de zebrafish. A) Utilização de crioprotetores; B) Utilização de extensores; C) Utilização de dispositivos; D) Utilização de meios de criopreservação.

Diversos crioprotetores já foram testados para criopreservação de blastômeros, sendo o DMSO o mais utilizado no geral e a sacarose a mais utilizada entre os crioprotetores não permeáveis (Figura 9A). Diferentemente do que foi observado nos outros tipos de tecidos e células analisados nesse estudo, o extensor mais utilizado para a criopreservação de blastômeros foi a solução de soro fetal bovino (Figura 9B). Quanto aos dispositivos para criopreservação e manutenção das amostras, observamos que a palheta de 0,25mL foi a mais utilizada, porém é interessante

ressaltar que a técnica de microgotas foi a segunda mais utilizada (Figura 9C), sendo a primeira vez que a técnica aparece nos protocolos de criopreservação de zebrafish, não sendo testada em nenhum outro tipo de amostra além de blastômeros. Com relação ao meio de criopreservação, observamos maior utilização do nitrogênio líquido em testes de vitrificação e freezer de taxa controlada para congelamento lento, sendo a maioria dos testes realizados com congelamento lento (Figura 9D).

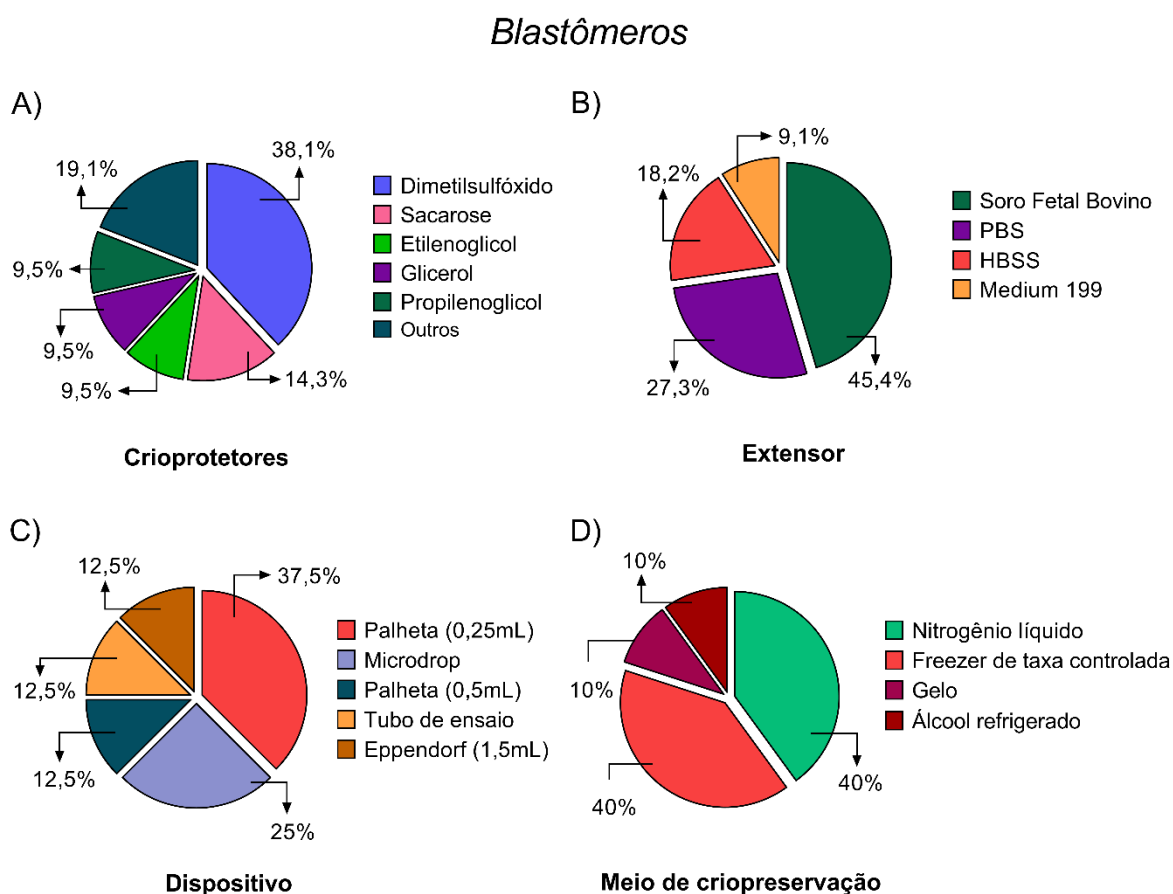


Figura 9. Dados percentuais de utilização de materiais e métodos para criopreservação de blastômeros de zebrafish. A) Utilização de crioprotetores; B) Utilização de extensores; C) Utilização de dispositivos; D) Utilização de meios de criopreservação.

Os protocolos com criopreservação de PGCs apresentaram uma variedade de crioprotetores, sendo o etilenoglicol e o DMSO os mais utilizados (Figura 10A). Observou-se que na maioria dos protocolos utilizou extensores com base protéica, sendo a maioria dos trabalhos com a albumina sérica bovina (50%) seguida pelo soro fetal bovino (25%), o restante dos estudos utilizou o HBSS (Figura 10B). Dentre os dispositivos utilizados para criopreservar as PGCs as malhas de nylon aparecem na

maioria dos trabalhos (Figura 10C). Com relação ao meio de criopreservação, observamos maior utilização do nitrogênio líquido, indicando o uso da vitrificação como técnica na maioria dos estudos (Figura 10D).

Células Germinativas Primordiais - PGCs

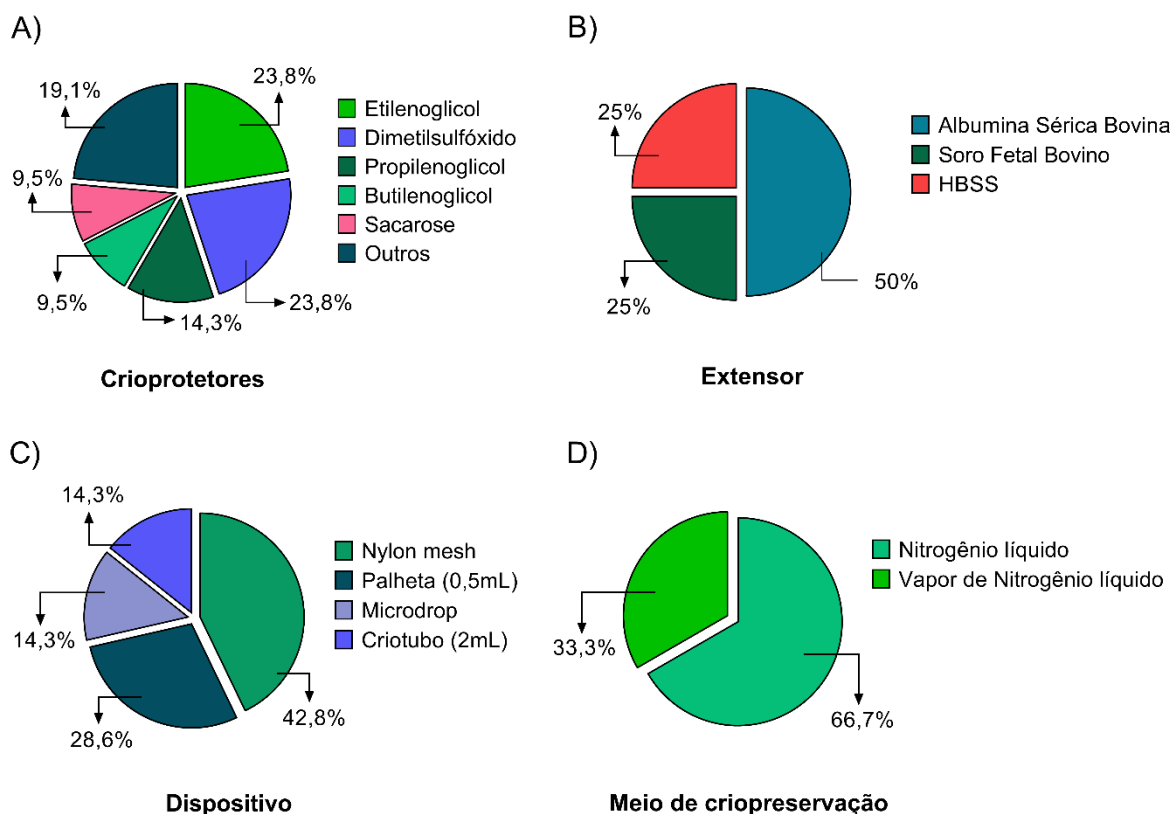


Figura 10. Dados percentuais de utilização de diferentes materiais e métodos para criopreservação de PGCs de zebrafish. A) Utilização de crioprotectores; B) Utilização de extensores; C) Utilização de dispositivos; D) Utilização de meios de criopreservação.

4. Discussão

Selecionamos dentre os artigos encontrados na busca aqueles que se encaixavam no objetivo do estudo, de forma que fosse possível construir um cenário ao longo do tempo, sobre o desenvolvimento de técnicas de congelamento e vitrificação de células e tecidos reprodutivos de zebrafish. Desta forma essa revisão sistemática possibilitou a identificação de melhores resultados observados nos estudos de maneira imparcial, o que permite a identificação de limitações e tendências dos estudos dessa área de pesquisa. Contudo, é importante ressaltar que artigos publicados relacionados ao tema podem não ter sido encontrados na busca realizada,

pois pode haver diferenças nos termos de indexação e palavras chaves utilizados, apesar da pesquisa ter sido conduzida de forma minuciosa e crítica pelos autores.

A análise dos dados nos permitiu identificar que a maior parte das publicações foi realizada a partir dos anos 2000, sendo a última década (2010-2019) a de maior número de trabalhos publicados. Apesar do grande volume de artigos nos últimos dez anos, podemos observar que a criopreservação de embriões e sêmen já são estudadas há quatro décadas, mostrando que além da conservação de gametas, a preservação do genoma diploide é um objetivo a ser alcançado com a criopreservação de embriões. Entretanto, ainda há poucos registros de sucesso de criopreservação de embriões de peixes até o momento (Zhang *et al.*, 2020), sendo o zebrafish não está entre as espécies que apresentaram algum resultado positivo na criopreservação de embriões até o momento. Essa dificuldade em se obter sucesso na criopreservação de embriões de peixes está relacionada ao tamanho dos embriões de peixes, baixa permeabilidade, membrana dupla e alto conteúdo de gema no ovo (Chen e Tian, 2005). Em relação ao sêmen, esse é o material mais utilizado em estudos de criopreservação em peixes, tendo estudos realizados com mais de 200 espécies (Tiersch *et al.*, 2007). A criopreservação de sêmen nesse sentido, ainda é o caminho mais acessível para preservação do material genético da espécie, apesar das dificuldades ao se trabalhar com esse tipo de material em zebrafish. Dessa maneira, é necessário o constante aprimoramento da técnica (Diogo *et al.*, 2019). Observamos também que estudos baseados na criopreservação de material genético materno são mais recentes, ocorrendo apenas nos últimos 20 anos. Além disso, protocolos utilizando a criopreservação de fragmentos de tecido gonadal ou da gônada inteira, tanto de machos quanto de fêmeas são ainda mais recentes, aparecendo apenas na última década. Portanto, acreditamos que esses estudos se apresentam como uma nova tendência para desenvolvimento de futuros protocolos, trazendo novas possibilidades de materiais para a preservação do genoma da espécie. Também é importante lembrar que o zebrafish é um modelo biológico, e que técnicas e protocolos desenvolvidos a partir de seus tecidos e células reprodutivas podem servir de modelo para outras espécies.

Primeiramente foi possível observar que a maior parte dos estudos utilizados nessa revisão tiveram como objetivo avaliar protocolos de criopreservação com apenas um método (congelamento ou vitrificação) e em apenas um tipo de amostra (sêmen, tecido/folículo ovariano, embrião, blastômero, PGCs e gônada masculina), ou

seja, os trabalhos focaram em avaliar uma técnica de criopreservação em apenas um tipo de amostra. As exceções foram os trabalhos de Harvey (1983) e Martínez-Páramo *et al.* (2009), que avaliaram a criopreservação de embriões e blastômeros no mesmo estudo, o trabalho de Higaki *et al.* (2013) que avaliou a criopreservação de embriões e PGCs, e os trabalhos de Marinovic *et al.* (2018, 2019) que avaliaram a criopreservação de tecido gonadal de machos de zebrafish, visando a preservação de espermatogônias. Sobre o método de criopreservação, os estudos de Martínez-Páramo *et al.* (2009) e Riesco *et al.* (2012) avaliaram tanto o congelamento quanto a vitrificação no mesmo trabalho, além do trabalho de Marques *et al.* (2019), que foi o único trabalho que avaliou e comparou diretamente as técnicas de congelamento lento e vitrificação.

O congelamento foi utilizado em 35 estudos e a vitrificação em 18 estudos. Esperava-se que o método de congelamento fosse o mais explorado, tendo em vista que é considerado o método convencional de criopreservação, enquanto a vitrificação é um método alternativo ao congelamento, sendo sua utilização mais recente. Apesar da maioria dos estudos serem realizados com o método de congelamento, a vitrificação foi predominante em estudos com embriões, PGCs e testículo/espermatogônias. Em essência, os métodos de congelamento e vitrificação apresentam duas principais variações, que são a taxa de resfriamento e a concentração dos crioprotetores utilizados.

Na maior parte dos estudos, observou-se o uso de crioprotetores de maneira associado a outros crioprotetores e a um extensor. Esta associação dos crioprotetores é utilizada visando reduzir a toxicidade global e obter o efeito aditivo de cada um dos crioprotetores (De Carvalho *et al.*, 2014). Dentre os crioprotetores utilizados podemos observar que no geral, o metanol foi o crioprotetor mais utilizado, seguido do DMSO. Os crioprotetores são compostos químicos naturais ou sintéticos utilizados a fim de proteger as células dos danos causados durante a criopreservação, sendo a principal função a de remover e/ou substituir o líquido intracelular (Ebertz e McGann, 2004). Um agente crioprotetor permeável deve apresentar como características o baixo peso molecular, baixa toxicidade e alta capacidade de atravessar a membrana celular (Fahy, 2010). Quanto aos crioprotetores externos ou não permeáveis, a sacarose foi a mais utilizada, seguido pelo leite em pó, trealose e glicose. Esses crioprotetores externos geralmente são menos tóxicos que os internos, e podem resultar em um efeito benéfico sobre o material criopreservado, oferecendo estabilidade e reparação

externa a membrana celular (Cabrita *et al.*, 2006). Por serem compostos hidrofílicos, eles se ligam as moléculas de água, aumentando a viscosidade da solução e diminuindo a formação de cristais de gelo (Fahy, 2007).

De maneira geral, os extensores mais utilizados foram o HBSS e o L-15. Apesar dos extensores terem papel de grande importância por servirem de meios nutritivos para as células e darem mais estabilidade a solução e as membranas plasmáticas das células, diminuindo assim os danos osmóticos, podemos observar que poucos estudos testaram diferentes extensores na mesma pesquisa, sendo que na maioria das vezes não está claro a justificativa dos autores para a escolha do extensor utilizado em seu protocolo. Futuros estudos que visem avaliar com mais detalhamento os efeitos de diferentes extensores nos protocolos de criopreservação são importantes para o refinamento das técnicas já utilizadas.

Com relação ao dispositivo utilizado para o armazenamento das amostras durante o processo de criopreservação, observamos uma grande variedade de materiais utilizados. No geral, palhetas plásticas de 0,25mL e 0,5mL, além de criotubo de 2mL, foram os mais utilizados. A escolha do dispositivo deve levar em consideração principalmente a técnica de criopreservação utilizada, pois irá influenciar diretamente na taxa de resfriamento da amostra. Além de considerar a praticidade no uso, a facilidade no manejo e a segurança quanto a possibilidade de contaminação da amostra.

O sêmen foi o material mais utilizado nas pesquisas, o que era esperado, tendo em vista que o sêmen é o material mais explorado na criopreservação em peixes (De Carvalho *et al.*, 2014, Tiersch *et al.*, 2007). Contudo, apesar de semelhanças estruturais, morfológicas e biofísicas observadas entre os espermatozoides de zebrafish e outras espécies de ciprinídeos (Zhang *et al.*, 2014), é importante reconhecer que a criopreservação de espermatozoides de zebrafish é difícil, devido ao baixo volume de espermatozoides, a baixa qualidade pós descongelamento e alta variação no sucesso da fertilização *in vitro*, tanto no esperma fresco quanto criopreservado (Diogo *et al.*, 2019). Os estudos demonstram uma grande variação nos resultados obtidos com os protocolos testados. Apesar de grande parte dos estudos apresentarem as taxas de fertilização que é o parâmetro considerado o mais indicado para a validação do sucesso da técnica (Cabrita *et al.*, 2010; Gallego e Asturiano, 2018), a maioria não indica as taxas de eclosão, o que impede a avaliação da eficiência do protocolo de criopreservação, pois o número de larvas obtidas a partir do

sêmen criopreservado acaba sendo desconhecido. Contudo, em termos de viabilidade após o descongelamento, os estudos que apresentaram resultados positivos utilizaram como meio de criopreservação o gelo seco (Harvey *et al.*, 1982; Morris *et al.*, 2003; Charmicael *et al.*, 2009) e gelo seco triturado (Ransom e Son, 1999; Draper e Moens, 2009; Matthews *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2019) o freezer de taxa controlada (Yang *et al.*, 2007, 2016; Hagedorn *et al.*, 2012; Bai *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015; Diogo *et al.*, 2018) e mais recentemente o ultra-freezer -150°C (Diogo *et al.*, 2018, 2019). A ausência de testes de vitrificação para sêmen de zebrafish abre uma oportunidade para que estudos sejam realizados nessa área. Estudos com vitrificação de sêmen de outras espécies de peixes estão sendo utilizados e apresentando resultados interessantes como mostra a revisão sobre o tema de Xin *et al.* (2017).

Com relação aos resultados obtidos com os trabalhos com a criopreservação de sêmen de zebrafish, a maior motilidade espermática observada foi de 78% (Yang *et al.*, 2007), a maior viabilidade observada foi de cerca de 66% (Hagedorn *et al.*, 2012), a maior taxa de fertilização observada foi de cerca de 90% (Diogo *et al.*, 2018) e a maior taxa de eclosão foi de cerca de 60% em trabalho de Wang *et al.* (2015). De maneira geral, é difícil realizar uma comparação direta dos resultados apresentados pelos diferentes trabalhos publicados, pois as técnicas utilizadas para avaliação foram diferentes e o período e forma de observação da fertilização foi diferente entre os trabalhos, além disso, apenas os trabalhos de Wang *et al.* (2015) e Diogo *et al.* (2018, 2019) relataram dados de larvas eclodidas a partir de sêmen de zebrafish criopreservado, tornando difícil a avaliação da real efetividade de cada protocolo realizado. Destacamos os trabalhos realizados por Diogo *et al.* (2018, 2019), que trazem uma técnica diferentes para realização da criopreservação com o ultra-freezer (-150°C) e também relatam os efeitos da criopreservação sobre o desenvolvimento das larvas após a eclosão, dando um passo a mais na avaliação da real eficiência dos protocolos praticados até o presente momento.

Mais recentemente dois estudos publicados por Marinovic *et al.* (2018, 2019), demonstraram a possibilidade de criopreservação em machos de zebrafish, desenvolvendo protocolos para a preservação de espermatogônias, apresentando resultados com mais de 50% de espermatogônias viáveis após o aquecimento das amostras. O protocolo se baseou na criopreservação dos testículos de zebrafish, com o objetivo de possibilitar no futuro o transplante desse tipo de células em animais receptores, de forma que seja possível diferenciá-las tanto em espermatozoides

quanto em óvulos. Essa técnica diminuiria a dificuldade de se preservar o genoma feminino e diploide da espécie.

Sobre a criopreservação de tecidos e células reprodutivas de fêmeas de zebrafish, os estudos foram focados na criopreservação de oócitos imaturos (estágios I e II) ou em estágio III de desenvolvimento, ou com fragmentos de tecido ovariano, sem dissociar as células e selecionar folículos previamente a criopreservação. Após 11 anos desde os primeiros estudos nessa área, publicados por Guan *et al.* (2008) e Zhang *et al.* (2008), diversos crioprotetores já foram testados (Godoy *et al.*, 2013), assim como as técnicas de congelamento lento e vitrificação já foram comparadas (Marques *et al.*, 2019). Aprimoramentos das técnicas utilizadas foram desenvolvidas e resultados positivos de viabilidade celular após a criopreservação foram obtidos nos estudos. As maiores taxas de viabilidade celular observada após o processo de criopreservação foram nos trabalhos publicados por Guan *et al.* (2008) que relataram 88% de viabilidade de oócitos após o congelamento de folículos ovarianos; e o trabalho realizado por Zampolla *et al.* (2011), que obtiveram cerca de 90% de viabilidade de oócitos após realização de congelamento de fragmentos de tecido ovariano. Contudo, os resultados ainda se limitam a informações de conhecimentos basais sobre o efeito da criopreservação nas células, pois a utilização prática dessas células para fertilização ainda não é possível ou pouco provável, tendo em vista que não se obteve sucesso na criopreservação de oócitos maduros, que estão prontos para serem fertilizados. Sendo assim, estudos estão sendo realizados visando a maturação dos oócitos *in vitro*, e já apresentam resultados promissores (Silva *et al.*, 2018), o que pode possibilitar em breve que os oócitos imaturos viáveis após a criopreservação, sejam utilizados para fertilização, depois de serem maturados *in vitro*.

Apesar dos resultados obtidos nos estudos com todos os tipos de células e tecidos serem bastante variáveis, e em muitos casos apresentarem poucas respostas positivas, a criopreservação de embrião de zebrafish foi o único que não obteve sucesso, pois diferentemente da criopreservação de embriões de mamíferos, a criopreservação de embriões de peixes ainda apresenta poucos resultados positivos. Para os protocolos aplicados até o presente momento para criopreservação de embriões de zebrafish, os trabalhos publicados por Zhang e Rawson (1996) e Martínez-Páramo *et al.* (2009), conseguiram observar viabilidade morfológica de embriões após o processo de criopreservação, contudo, não conseguiram obter

desenvolvimento dos embriões e eclosão, tornando a criopreservação de embriões de zebrafish ainda não efetiva. Isso reflete em uma redução dos estudos avaliando a criopreservação de embriões ao longo do tempo, pois como não foi obtido êxito nos protocolos devido à ausência de viabilidade celular, os estudos nessa área acabaram se tornando mais escassos e dando espaço as tentativas de criopreservação de outros tipos de amostras, como os gametas e células primordiais. Nesse sentido, blastômeros e células germinativas primordiais já apresentaram eficiência em protocolos de criopreservação testados até o momento, sendo o trabalho de Cardona-Costa e García-Ximénez (2007) que obteve cerca de 93% de viabilidade de blastômeros após a vitrificação e o trabalho de Riesco *et al.* (2012) que obteve cerca de 92% de viabilidade de PGCs após congelamento, os que apresentaram os maiores índices de viabilidade celular após o processo de criopreservação. As células primordiais apresentam limitações quanto ao seu uso após a criopreservação, tendo em vista que as técnicas de maturação e implante dessas células em materiais receptores ainda são muito novas e apresentam ainda muitas dificuldades de aplicação, sendo um campo de pesquisa ainda que deve evoluir nos próximos anos e explorado com maior frequência, tendo em vista que os estudos realizados até o momento já apresentam eficiência quanto a viabilidade celular desses materiais após a criopreservação.

Essa revisão sistemática permitiu de maneira inédita e detalhada a compilação e apresentação de dados dos artigos publicados na área de criopreservação utilizando o zebrafish como modelo. A caracterização das pesquisas aqui apresentadas, permite uma visão geral e direta dos protocolos de criopreservação aplicados até agora. A inclusão dos estudos nesta revisão e a partir da seleção sistemática, o agrupamento de informações metodológicas essenciais aplicadas em cada pesquisa, e a quantificação da utilização de cada parâmetro das técnicas de criopreservação para cada tipo de amostra, permite uma avaliação mais criteriosa dos protocolos de criopreservação em zebrafish já utilizados. Desta maneira foi possível entender melhor o caminho percorrido pelos estudos nessa área de pesquisa, possibilitando identificar limitações e dificuldades, assim como identificar lacunas deixadas nos estudos. Além disso, a análise dos dados possibilitou a identificação de possíveis tendências de estudos futuros e desta forma, projetar possíveis caminhos a serem seguidos na área.

Por fim, observou-se nesta revisão sistemática que as diferenças metodológicas e as particularidades de cada estudo são uma limitação para uma avaliação mais segura da eficiência destes protocolos. Apesar de alguns resultados serem desfavoráveis, como no caso da criopreservação de embriões e das divergências metodológicas entre trabalhos, que dificultam a padronização dos protocolos de criopreservação, já é possível estabelecer os principais aspectos para o desenvolvimento de protocolos melhorados, como os componentes mais utilizados nos protocolos e utilizados mais recentemente, apresentando resultados mais promissores. Assim, as evidências científicas apresentadas nesta revisão podem contribuir para novos estudos de criopreservação em zebrafish. Além disso, acreditamos que as informações contidas nessa revisão sistemática podem servir como ponto inicial de estudo para novos pesquisadores que desejam trabalhar na área de criopreservação utilizando o zebrafish como modelo biológico, por trazer informações de histórico e detalhes metodológicos de maneira resumida em tabelas e ilustrativas em gráficos.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi apoiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

- Amatruda JF, Shepard JL, Stern HM, Zon LI (2002) Zebrafish as a cancer model system. *Cancer Cell* **1**:229–231
- Anil S, Rawson D, Zhang T (2018) Development of molecular markers for zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicle growth assessment following in-vitro culture in cryopreservation studies. *Cryobiology* **83**:75–83. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.05.004>
- Bai C, Wang X, Lu G, Wei L, Liu K, Gao H, et al. (2013) Cooling rate optimization for zebrafish sperm cryopreservation using a cryomicroscope coupled with SYBR14/PI dual staining. *Cryobiology* **67**:117–123. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.05.011>
- Cabrita E, Robles V, Wallace JC, Sarasquete MC, Herráez MP (2006) Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. *Aquaculture* **251**:245–255. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.077>
- Cabrita E, Sarasquete C, Martínez-Páramo S, Robles V, Beirão J, Pérez-Cerezales S, et al (2010) Cryopreservation of fish sperm: Applications and perspectives. *J Appl Ichthyol* **26**:623–635. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01556.x>
- Cardona-Costa J, Francisco-Simão M, García-Ximénez F (2009) Can vitrified zebrafish blastomeres be used to obtain germ-line chimaeras? *Cryo Letters* **30**:422–8

- Cardona-Costa J, García-Ximénez F (2007) Vitrification of zebrafish embryo blastomeres in microvolumes. *Cryo Letters* **28**:303–9
- Carmichael C, Westerfield M, Varga ZM (2009) Cryopreservation and in vitro fertilization at the zebrafish international resource center. *Methods Mol Biol* **546**:45–65. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-977-2_4
- Chen SL, Tian YS (2005) Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. *Theriogenology* **63**:1207-1219. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.06.007>
- De Carvalho AFS, Ramos SE, De Carvalho TSG, De Souza YCP, Zangeronimo MG, Pereira LJ, et al. (2014) Efficacy of fish embryo vitrification protocols in terms of embryo morphology — A systematic review. *Cryo-Letters* **35**:361–370
- Devismita D, Kumar A (2015) Effect of cryoprotectant on optimal cooling rate during cryopreservation. *Cryobiology* **70**:53–59. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.12.002>
- Diogo P, Martins G, Nogueira R, Marreiros A, Gavaia PJ, Cabrita E. (2019) Cryoprotectants synergy improve zebrafish sperm cryopreservation and offspring skeletogenesis. *Cryobiology* **91**:115–127. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.10.001>
- Diogo P, Martins G, Quinzico I, Nogueira R, Gavaia PJ, Cabrita E. (2018) Electric ultrafreezer (– 150 °C) as an alternative for zebrafish sperm cryopreservation and storage. *Fish Physiol Biochem* **44**:1443–1455. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0500-6>
- Draper BW, McCallum CM, Stout JL, Slade AJ, Moens CB. (2004) A high-throughput method for identifying N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-induced point mutations in zebrafish. *Methods Cell Biol* **2004**:91–112. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(04\)77005-3](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(04)77005-3)
- Draper BW, Moens CB (2009) A high-throughput method for zebrafish sperm cryopreservation and in vitro fertilization. *J Vis Exp* **29**:1-5. <https://doi.org/10.3791/1395>
- Ebertz SL, McGann LE (2004) Cryoprotectant permeability parameters for cells used in a bioengineered human corneal equivalent and applications for cryopreservation. *Cryobiology* **49**:169–180. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.06.005>
- Fahy GM (2010) Cryoprotectant toxicity neutralization. *Cryobiology* **60**:S45-53. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.05.005>
- Fahy GM (2007) Theoretical considerations for oocyte cryopreservation by freezing. *Reprod Biomed Online* **14**:709–14. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60672-4](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60672-4)
- Gallego V, Asturiano JF (2018) Fish sperm motility assessment as a tool for aquaculture research: a historical approach. *Rev Aquac* **11**:697–724. <https://doi.org/10.1111/raq.12253>
- Godoy LC, Streit DP, Zampolla T, Bos-Mikich A, Zhang T. (2013) A study on the vitrification of stage III zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. *Cryobiology* **67**:347–354. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.10.002>
- Guan M, Rawson DM, Zhang T (2008) Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes using improved controlled slow cooling protocols. *Cryobiology* **56**:204–208. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.03.001>
- Guan M, Rawson DM, Zhang T (2010) Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes by vitrification. *Cryo Letters* **31**:230–8

- Hagedorn M, McCarthy M, Carter VL, Meyers SA (2012) Oxidative Stress in Zebrafish (*Danio rerio*) Sperm. *PLoS One* **7**:e39397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039397>
- Harvey B (1983) Cooling of embryonic cells, isolated blastoderms, and intact embryos of the zebra fish *Brachydanio rerio* to -196 °c. *Cryobiology* **20**:440–447. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(83\)90034-2](https://doi.org/10.1016/0011-2240(83)90034-2)
- Harvey B, Kelley RN, Ashwood-Smith MJ (1982) Cryopreservation of zebra fish spermatozoa using methanol. *Can J Zool* **60**:1867–1870. <https://doi.org/10.1139/z82-242>
- Higaki S, Kawakami Y, Eto Y, Yamaha E, Nagano M, Katagiri S, et al. (2013) Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by vitrification of yolk-intact and yolk-depleted embryos using various cryoprotectant solutions. *Cryobiology* **67**:374–382. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.10.006>
- Higaki S, Mochizuki K, Akashi Y, amaha E, Katagiri S, Takahashi Y. (2010) Cryopreservation of primordial germ cells by rapid cooling of whole zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J Reprod Dev* **56**:212–8. <https://doi.org/10.1262/jrd.09-136e>
- Higaki S, Mochizuki K, Baba H, Akashi Y, Yamaha E, Katagiri S, et al. (2009) Feasibility of cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by whole embryo freezing. *Jpn J Vet Res* **57**:119–28
- Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* **496**:498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Janik M, Kleinhans FW, Hagedorn M (2000) Overcoming a permeability barrier by microinjecting cryoprotectants into zebrafish embryos (*Brachydanio rerio*). *Cryobiology* **41**:25–34. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2261>
- Kalueff A V., Stewart AM, Gerlai R (2014) Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* **35**:63–75
- Kopeika J, Zhang T, Rawson DM, Elgar G (2005) Effect of cryopreservation on mitochondrial DNA of zebrafish (*Danio rerio*) blastomere cells. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* **570**:49–61. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.09.007>
- Lawrence C (2007) The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture* **269**:1–20
- Lieschke GJ, Currie PD (2007) Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.* **8**:353–367
- Lin C, Zhang T, Rawson DM (2009a) Cryopreservation of zebrafish (*danio rerio*) blastomeres by controlled slow cooling. *Cryo-Letters* **30**:132–141
- Lin C, Spikings E, Zhang T, Rawson DM (2009b) Effect of chilling and cryopreservation on expression of Pax genes in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and blastomeres. *Cryobiology* **59**:42–47. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.04.007>
- Lin C, Spikings E, Zhang T, Rawson D (2009c) Housekeeping genes for cryopreservation studies on zebrafish embryos and blastomeres. *Theriogenology* **71**:1147–1155. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.12.013>
- Marinovic Z, Li Q, Lujic J, Iwasaki Y, Csenki Z, Urbanyi B, et al. (2019) Preservation of zebrafish genetic resources through testis cryopreservation and spermatogonia transplantation. *Sci Rep* **9**:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50169-1>
- Marinovic Z, Lujic J, Kása E, Csenki Z, Urbanyi B, Horváth Á. (2018) Cryopreservation of Zebrafish Spermatogonia by Whole Testes Needle Immersed Ultra-Rapid Cooling. *J Vis Exp.* **4**:1-7 <https://doi.org/10.3791/56118>

- Marques LS, Bos-Mikich A, Godoy LC, Silva LA, Maschio D, Zhang T, et al. (2015) Viability of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles after vitrification in a metal container. *Cryobiology* **71**:367–373
- Marques LS, Fossati AAN, Rodrigues RB, Da Rosa HT, Izaguirry AP, Ramalho JB, et al. (2019) Slow freezing versus vitrification for the cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian tissue. *Sci Rep* **9**:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51696-7>
- Martínez-Páramo S, Barbosa V, Pérez-Cereales S, Robles V, Herráez MP. (2009) Cryoprotective effects of antifreeze proteins delivered into zebrafish embryos. *Cryobiology* **58**:128–133. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.11.013>
- Martinez S, Robles V, Anel L, De Paz P, Herráez M. (2005) Cell Viability after Vitrification of Zebrafish Embryos. *Reprod Domest Anim* **40**:402. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2005.00590.x>
- Matthews JL, Murphy JM, Carmichael C, Yang H, Tiersch T, Westerfield M, et al. (2018) Changes to extender, cryoprotective medium, and in vitro fertilization improve zebrafish sperm cryopreservation. *Zebrafish* **15**:279–290. <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1521>
- Morris JP, Berghmans S, Zahrieh D, Neuberg DS, Kanki JP, Look AT. (2003) Zebrafish sperm cryopreservation with N,N-dimethylacetamide. *Biotechniques* **35**:956–968. <https://doi.org/10.2144/03355st03>
- Ransom DG, Zon LI (1999) Collection, storage, and use of zebrafish sperm. *Methods Cell Biol.* **60**:365–372
- Riesco MF, Martínez-Pastor F, Chereguini O, Robles V (2012) Evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) PGCs viability and DNA damage using different cryopreservation protocols. *Theriogenology* **77**:122–30, 130.e1–2. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.024>
- Riesco MF, Robles V (2013) Cryopreservation Causes Genetic and Epigenetic Changes in Zebrafish Genital Ridges. *PLoS One* **8**:e67614. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067614>
- Robles V, Cabrita E, De Paz P, Cuñado S, Anel L, Herráez MP. (2004) Effect of a vitrification protocol on the lactate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities and the hatching rates of Zebrafish (*Danio rerio*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos. *Theriogenology* **61**:1367–1379. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.08.010>
- Silva LA, Marques LS, Zhang T, Rodrigues RB, Eloy LR, (2018) Production of live larvae following in vitro maturation of zebrafish oocytes. *Theriogenology* **105**:115–119. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.09.021>
- Silva C, Kollár T, Csenki-Bakos Z, Fernandes BHV, Horvath A, Carvalho LR (2019) An Easy Method for Cryopreservation of Zebrafish (*Danio rerio*) Sperm. *Zebrafish* **16**:321–323. <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1696>
- Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C (2008) The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol. Rev.* **83**:13–34
- Tiersch TR, Yang H, Jenkins JA, Dong Q (2007) Sperm cryopreservation in fish and shellfish. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* **65**:493–508
- Tsai S, Rawson DM, Zhang T (2009) Development of cryopreservation protocols for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles using controlled slow cooling. *Theriogenology* **71**:1226–1233. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.01.014>
- Tsai S, Rawson DM, Zhang T (2010) Development of in vitro culture method for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles for use in cryopreservation studies.

- Theriogenology* **74**:290–303.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.02.013>
- Wang G, Kang N, Gong H, Luo Y, Bai C, Chen Y, et al. (2015) Upregulation of uncoupling protein Ucp2 through acute cold exposure increases post-thaw sperm quality in zebrafish. *Cryobiology* **71**:464–471.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.08.016>
- Xin M, Siddique MAM, Dzyuba B, Cuevas-Urbe R, Shaliutina-Kolešová A, Linhart O. (2017) Progress and challenges of fish sperm vitrification: A mini review. *Theriogenology* **98**:16–22. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.043>
- Yang H, Carmichael C, Varga ZM, Tiersch TR (2007) Development of a simplified and standardized protocol with potential for high throughput for sperm cryopreservation in zebrafish *Danio rerio*. *Theriogenology* **68**:128–136.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.02.015>
- Yang H, Daly J, Carmichael C, Matthews J, Varga ZM, Tiersch T. (2016) A Procedure-Spanning Analysis of Plasma Membrane Integrity for Assessment of Cell Viability in Sperm Cryopreservation of Zebrafish *Danio rerio*. *Zebrafish* **13**:144–151.
<https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1176>
- Zampolla T, Rawson DM, Zhang T (2012) The use of fetal bovine serum for cryopreservation of stage III zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. *Cryo Letters* **33**:435–42
- Zampolla T, Spikings E, Srirangarajah S, Rawson DM, Zhang T. (2011) Impact of cryoprotectants and cryopreservation on metabolic activity and cytoskeleton proteins of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian fragments. *Cryo Letters* **32**:525–36
- Zhang L, Wang S, Chen W, Hu B, Ullah S, Zhang Q, et al. (2014) *Pakistan Veterinary Journal Fine Structure of Zebrafish (Danio rerio) Spermatozoa*. 14–100
- Zhang T, Rawson DM (1996) Feasibility studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Cryobiology* **33**:1–13.
<https://doi.org/10.1006/cryo.1996.0001>
- Zhang T, Rawson DM, Morris GJ (1993) Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Aquat Living Resour* **6**:145–153.
<https://doi.org/10.1051/alr:1993014>
- Zhang T, Rawson DM, Tosti L, Carnevali O (2008) Cathepsin activities and membrane integrity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes after freezing to -196 °C using controlled slow cooling. *Cryobiology* **56**:138–143.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.01.002>
- Zhang J, Tian Y, Li Z, Wu Y, Li Z, Cheng M, Wang L, Ma W, Zhai J (2020) Optimization of vitrification factors for embryo cryopreservation of kelp grouper (*Epinephelus moara*). *Theriogenology* **142**:390–399.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.10.002>

1. **CAPÍTULO III***

Leite em pó desnatado como crioprotetor não permeável diminui os danos oxidativos e ao DNA em sêmen de zebrafish criopreservado

*Artigo elaborado seguindo modelo de estrutura e formatação do periódico *Theriogenology*

Leite em pó desnatado como crioprotetor não permeável diminui os danos oxidativos e ao DNA em sêmen de zebrafish criopreservado

Rômulo Batista Rodrigues^{1*}, Mariana Uczay², Verônica Bidinotto Brito^{3,4}, Ana Amélia Nunes Fossati¹, Antonio Cesar Godoy⁵, Dinara Jaqueline Moura⁴, Carla Ivane Ganz Vogel⁶, Danilo Pedro Streit Jr.¹

¹Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Terapêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Departamento de Fisioterapia, Faculdades Integradas de Taquara, Taquara, RS, Brasil.

⁴Laboratório de Genética Toxicológica, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁵Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.

⁶Laboratório de Bioquímica, Programa multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC, Brasil.

*Autor correspondente: Rômulo Batista Rodrigues, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Endereço: Avenida Bento Gonçalves 7712, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: rrodrigues1903@gmail.com.

Resumo: O objetivo do presente estudo foi avaliar a combinação e interação de diferentes extensores, crioprotetores permeáveis e não permeáveis, analisando os efeitos da criopreservação de sêmen de zebrafish através de uma abordagem ampla de variáveis. Foram utilizados dois extensores, a solução salina balanceada de Hank (HBSS) e solução de Ginsburg. Foram utilizadas oito soluções crioprotetoras: SC1 (HBSS + DMSO 8%), SC2 (HBSS + Metanol 8%), SC3 (HBSS + DMSO 8% + Leite em pó desnatado 15%), SC4 (HBSS + Metanol 8% + Leite em pó desnatado 15%), SC5 (Ginsburg + DMSO 8%), SC6 (Ginsburg + Metanol 8%), SC7 (Ginsburg + DMSO 8% + Leite em pó desnatado 15%) e SC8 (Ginsburg + Metanol 8% + Leite em pó desnatado 15%). As amostras foram criopreservadas em criotubos por 20 minutos em gelo seco, armazenadas em nitrogênio líquido, descongeladas a 38°C por 10 segundos e analisadas. A taxa e tempo de motilidade não diferiu entre os grupos criopreservados. A viabilidade foi maior nos tratamentos contendo leite em pó, em comparação ao tratamento SC1. A integridade de membrana foi maior nos tratamentos SC4, SC7 e SC8, com leite em pó, em comparação ao SC1 e SC5. O percentual de espermatozoides com morfologia normal foi maior nos tratamentos SC2, SC3, SC4 e SC7 em comparação ao SC5 e SC6. A criopreservação aumentou as patologias espermáticas, em especial para cauda enrolada, gota proximal, cabeça degenerada e cabeça solta. A peroxidação lipídica não foi diferente entre os grupos criopreservados. A geração de espécies reativas de oxigênio foi menor no tratamento SC4, que também apresentou a maior atividade da enzima superóxido dismutase. Para atividade da enzima catalase, os maiores valores foram observados nos tratamentos SC7 e SC8 e os menores valores nos tratamentos SC1, SC3 e SC6. O tratamento SC8 apresentou maior quantificação de grupos sulfidrílicos totais, enquanto o SC6 o menor valor. A análise do ensaio cometa demonstrou que as amostras criopreservadas com as soluções contendo leite em pó apresentaram menores percentuais de danos no DNA. De maneira geral, observou-se que a adição do leite em pó desnatado como crioprotetor não permeável reduziu os danos causados pela criopreservação de sêmen de zebrafish, em especial para os danos causados pelo estresse oxidativo e ao DNA.

Palavras chave: Crio injurias, crioprotetores, *Danio rerio*, danos no DNA, ensaio cometa, estresse oxidativo.

1. Introdução

O zebrafish (*Danio rerio*) apresenta diversas características interessantes para um modelo biológico, como alta fecundidade, tempo entre gerações curto, rápido desenvolvimento, embriogênese externa, embriões translúcidos e fácil manutenção em laboratório [1]. Essas características fazem do zebrafish um modelo frequentemente utilizado em todo mundo, com laboratórios de mais de 100 países utilizando a espécie como modelo, em diversas áreas de pesquisa [2]. Conseqüentemente, novas linhagens são desenvolvidas continuamente, resultando em desafios em termos de espaço e gerenciamento desse recurso genético, possível de ser contornado pela criopreservação [3].

A criopreservação de sêmen é uma ferramenta útil testada em mais de 200 espécies de peixes [4]. Sendo que a criopreservação de sêmen de zebrafish foi publicada pela primeira vez em 1982 [5], e a partir desse trabalho diversos protocolos foram desenvolvidos e adaptados [6–16]. Contudo, uma característica em comum entre os protocolos de criopreservação de sêmen de zebrafish e de outras espécies de peixes são as inconsistências dos resultados com alta variabilidade na qualidade do sêmen pós-descongelamento [17,18].

Os diversos estudos com criopreservação de sêmen de zebrafish avaliaram diferentes tipos de dispositivos e meio de criopreservação, taxa de resfriamento, extensores, crioprotetores permeáveis e não permeáveis, produzindo uma quantidade significativa de informações, que indicam alguns procedimentos a serem adotados durante o processo de criopreservação. Porém, a comparação da combinação e interação de diferentes extensores, crioprotetores permeáveis e não permeáveis, foi pouco analisada. A combinação de diferentes componentes na solução crioprotetora é considerada uma boa estratégia para aumentar a viabilidade após criopreservação [19]. Além disso, a maioria dos trabalhos publicados com criopreservação de sêmen de zebrafish focaram em avaliações mais objetivas e diretas sobre o sucesso da criopreservação como a motilidade e taxa de fertilização. Porém, uma parte muito importante da pesquisa em criopreservação está focada em revelar as respostas físicas e biológicas subjacentes da célula e a causa dos danos gerados pela criopreservação [20].

Uma abordagem mais ampla dos danos causados pelo processo de criopreservação, em especial dos danos oxidativos e no DNA que foram pouco abordados na espécie, podem fornecer informações importantes que auxiliam a

elucidar a forma que as células são afetadas pela criopreservação e as principais fontes de crio-injúrias nos espermatozoides criopreservados. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi comparar a combinação e interação de diferentes extensores, crioprotetores permeáveis e não permeáveis, analisando os efeitos do processo de criopreservação sobre múltiplas variáveis, tais como sobrevivência, morfologia e integridade dos espermatozoides, danos oxidativos e ao DNA.

2. Material e métodos

2.1. Manutenção dos zebrafish

Os peixes foram mantidos em uma densidade de dois animais/L de água, em um fotoperíodo de 14:10 (luz:escuro), em temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e pH $7,1 \pm 1,2$, em aquários de vidro (30 litros) contendo aeração, termostato para controle e manutenção da temperatura da água e filtragem mecânica, química e biológica. Foi realizada a limpeza e remoção de sujidades diariamente, com renovação da água de aproximadamente 10% do volume total do aquário. Os peixes foram alimentados três vezes ao dia com ração comercial floculada (Alcon Basic®) e artêmia, até a saciedade aparente.

Foram utilizados 120 machos de zebrafish, aptos à reprodução com idade entre 6 a 12 meses. Os zebrafish selecionados para o experimento apresentaram peso médio de $487,76 \pm 128,65\text{mg}$, comprimento total médio de $35,08 \pm 3,46\text{mm}$, peso médio das gônadas ($5,42 \pm 4,27\text{mg}$), índice gonadossomático (IGS) de $1,09 \pm 0,77$, calculado através da fórmula $\text{IGS} = ((\text{peso da gônada}/\text{peso corporal}) \times 100)$, fator de condição (K) de $1,13 \pm 0,22$, calculado através da fórmula $K = ((\text{peso corporal}/\text{comprimento total}^3) \times 100)$ e concentração espermática de $1,20 \times 10^8 \pm 1,55 \times 10^8$ células/mL, que foi mensurado através de contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico (Eclipse E200, Nikon), em aumento de 400x.

O experimento foi realizado de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal – CONCEA e aprovado no Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sobre o projeto N° 35329.

2.2. Coleta e processamento do sêmen

Para a coleta das amostras de sêmen, os peixes foram eutanasiados em dose letal de triclaína metano sulfato ($0,6\text{mg/mL}$; $27 \pm 0,5^\circ\text{C}$; pH $7,1 \pm 0,1$) [21]. Em seguida os peixes foram enxaguados para retirada do anestésico, secos suavemente para

retirada do excesso de água e posteriormente foi mensurado o peso úmido dos animais e comprimento total. O sêmen foi coletado pela remoção cirúrgica dos testículos. O tecido aderente foi dissecado e os testículos colocados em microtubos de 1,5mL e pesados. Foi adicionado ao microtubo o extensor respectivo de cada tratamento (Seção 2.3 e 2.4) em uma proporção de gônada e extensor de 1:25 (peso da gônada: volume do extensor). O sêmen foi suspenso na solução por meio de lavagem com auxílio de pipeta, resumidamente, o tecido aderido foi pressionado suavemente com a ponteira contra o interior do microtubo, para que o tecido se abrisse e libera-se os espermatozoides, posteriormente o conteúdo foi pipetado consecutivamente (cerca de 10 vezes) de maneira suave para que o conteúdo seminal saia de dentro do tecido aderido, posteriormente o tecido da gônada foi retirado do microtubo. O método de coleta de sêmen por meio de lavagem dos testículos foi utilizado nesse estudo, a partir das recomendações e êxito relatados em diversos estudos em zebrafish [7,9,13,14,22]. Logo após a coleta do sêmen, uma amostra de 5µl de sêmen diluído foi retirada para avaliar se houve ativação prematura da motilidade.

Foram distribuídos dez “pools” de sêmen de seis machos cada, diluídos em HBSS para os tratamentos SC1, SC2, SC3 e SC4, e dez pools de sêmen de seis machos cada, diluídos em solução de Ginsburg para os tratamentos com as soluções SC5, SC6, SC7 e SC8, e seus respectivos controles frescos. Os “pools” foram distribuídos dessa forma, pois a coleta do sêmen foi realizada por meio de lavagem dos testículos dissecados com o extensor, sendo desta maneira a suspensão dos espermatozoides já realizada no extensor específico de cada tratamento.

2.3. Extensores

Foram utilizados dois extensores, a solução de Ginsburg e a solução salina balanceada de Hank (HBSS), para diluição do sêmen. Esses extensores foram escolhidos por serem os mais utilizados para a espécie, e foram utilizados de acordo com os diferentes grupos experimentais. A solução de HBSS utilizada foi composta de NaCl (8,0g), KCl (0,4g), CaCl₂·2H₂O (0,16g), MgSO₄·7H₂O (0,2g), Na₂HPO₄ (0,06g), KH₂PO₄ (0,06g), NaHCO₃ (0,35 g), C₆H₁₂O₆ (1,0g) em 1000mL de água destilada, sendo ajustado os valores de pH para 7,5, e de osmolaridade para 300mOsm/L. A solução de Ginsburg foi composta de NaCl (6,50g), KCl (0,250g), CaCl₂·2H₂O (0,350g)

e NaHCO_3 (0,20g) em 1000mL de água destilada, fazendo-se o ajuste da osmolaridade (300 mOsm/L) e pH (7,5).

2.4. Soluções crioprotetoras

Foram avaliadas as combinações de diferentes extensores e crioprotetores nos tratamentos. Sendo assim, os extensores HBSS e Ginsburg foram combinados com os crioprotetores permeáveis metanol e dimetilsulfóxido (DMSO), combinados ou não com o leite em pó desnatado como crioprotetor não permeável. As soluções de criopreservação utilizadas estão detalhadas na Tabela 1. As soluções foram preparadas para conterem o dobro do % de crioprotetores, pois no momento do congelamento metade da amostra é composta pelo sêmen diluído no extensor e a outra metade da solução crioprotetora. Desta maneira ao misturar a solução crioprotetora ao sêmen previamente diluído a concentração final dos crioprotetores serão as concentrações utilizadas para cada tratamento, como está demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Composição das soluções crioprotetoras utilizadas na criopreservação de sêmen de zebrafish.

Solução crioprotetora (SC)	HBSS	Ginsburg	DMSO ¹ (8%)	Metanol ² (8%)	Leite em pó ³ (15%)
SC 1	X		X		
SC 2	X			X	
SC 3	X		X		X
SC 4	X			X	X
SC 5		X	X		
SC 6		X		X	
SC 7		X	X		X
SC 8		X		X	X

^{1,2}Sigma-Aldrich®, ³Leite em pó desnatado Molico (Nestlé®)

2.5. Congelamento e descongelamento do sêmen

O sêmen já diluído no extensor de cada tratamento foi distribuído em criotubos (2mL) em um volume de 10µl por criotubo e posteriormente adicionado 10µl da solução crioprotetora do tratamento, misturando-se ao sêmen diluído com uma pipeta. A diluição final com a solução crioprotetora foi de 1:50 (gônada:volume de solução)

[14]. O tempo de equilíbrio da amostra com o crioprotetor antes do congelamento foi de 10 minutos, pois tempos maiores causam redução significativa da motilidade espermática pós-descongelamento [15].

Para o congelamento seguimos recomendações de Matthews et al. [14], para obter uma taxa de resfriamento de 14-16°C/min, considerada ideal para a espécie quando se utiliza gelo seco triturado em isopor como meio de criopreservação. Após o tempo de equilíbrio, o criotubo contendo a amostra foi colocado em um tubo falcon (15mL) acima de outro criotubo vazio e sem tampa, e logo em seguida o tubo falcon com a amostra foi colocado em gelo seco triturado durante 20 minutos. Ao término dos 20 minutos de congelamento, os criotubos com os diferentes tratamentos foram transferidos para o nitrogênio líquido para armazenamento. Para o descongelamento, as amostras foram aquecidas em banho-maria a 38°C durante 10 segundos [14] e posteriormente analisadas.

2.6. Avaliação de qualidade do sêmen

Todas as análises de avaliação de qualidade seminal foram realizadas para as amostras descongeladas de cada grupo criopreservado e para o sêmen fresco diluído em cada extensor.

2.7. Taxa de motilidade, tempo de motilidade e morfologia espermática

Para a ativação da motilidade espermática, 1µl de sêmen foi diluído em 20µl de solução com 80mM de NaCl (~ 160-200 mmol/kg) [23], em seguida um volume de 1µl desta solução foi colocado em lâmina e estimado a motilidade (10 segundos após ativação) em microscópio óptico de luz (Eclipse E200, Nikon), em aumento de 400x. A proporção de ativação de 1:20 (sêmen:ativador) foi realizada de acordo com Yang et al. [8]. A motilidade foi expressa como a porcentagem (0 a 100%) de espermatozoides que se moviam ativamente para frente, não considerando espermatozoides que vibravam no local [8]. Para o tempo de duração de motilidade, no momento da diluição, um cronômetro foi acionado e interrompido quando os espermatozoides cessaram todos os movimentos dentro do campo óptico. Foram analisadas oito amostras por tratamento, em triplicata.

Para a análise de morfologia espermática, a amostra de sêmen foi previamente fixada em solução de formol salina tamponada (4,6%) em uma proporção de 1:500 (sêmen:formol). Posteriormente a amostra fixada foi misturada ao corante Rosa de

Bengala (4%) em um microtubo (1,5mL), a uma diluição de 1:50 (rosa de bengala:sêmen fixado em formol tamponado 10%) e as lâminas então foram confeccionadas utilizando 20µL da amostra corada. Foi avaliada a morfologia de 200 espermatozoides/lâmina em um microscópio óptico (Eclipse E200, Nikon) em aumento de 1000x. Foram quantificados os percentuais de espermatozoides normais e anormais, e identificados os tipos de patologias seguindo orientações de Milliorini et al. [24] e Da Costa et al. [25]. Sendo que no presente estudo foram encontradas e quantificadas as seguintes patologias: macrocefalia, microcefalia, cabeça degenerada, cabeça solta, gota distal, gota proximal, cauda quebrada, cauda enrolada, cauda curta e cauda dobrada. Foram analisadas 10 lâminas por tratamento.

2.8. Integridade de membrana e viabilidade (Live/Dead)

Foram utilizadas duas técnicas para avaliação de integridade de membrana celular e viabilidade celular. A integridade de membrana foi analisada pelo método de coloração de eosina-nigrosina adaptado de Bloom [26], onde 10µL de sêmen foi misturado a 30µL de cada corante (eosina amarela 3% e nigrosina 5%). Após a confecção e secagem ao ar das lâminas, foram então analisadas por meio de microscópio óptico em aumento de 400x, sendo quantificado o percentual de espermatozoides com membrana íntegra em 200 espermatozoides por lâmina. Foram considerados íntegros os espermatozoides que apresentaram a cabeça não corada e não íntegros os espermatozoides que apresentaram a cabeça corada. Foram analisadas nove lâminas por tratamento.

A análise de viabilidade (Live/Dead) foi realizada segundo protocolo adaptado [13,27]. Especificamente, 10µL de amostra foram diluídos em 40µL de solução salina (0,9%) e corados com 100nM de SYBR14 (um corante de ácido nucleico que permeia a membrana) e 12µM de iodeto de propídio (corante que permeia células com membranas não integras), as lâminas foram confeccionadas utilizando 20µL da amostra corada. As células espermáticas foram então visualizadas com um microscópio de epi-fluorescência (Axio Imager A2, Carl Zeiss) em aumento de 400x e analisadas 200 células por lâmina. A viabilidade foi calculada como o número de células que se apresentaram coradas pelo SYBR14 (verde brilhante), dividido pelo número total de células. Foram analisadas cinco lâminas por tratamento.

2.9. Análises bioquímicas de estresse oxidativo

2.9.1. Quantificação proteica

A concentração de proteína nos extratos proteicos foi determinada de acordo com o método descrito por Bradford [28], utilizando albumina sérica bovina como padrão e em leitura espectrofotométrica a 595nm. Este método baseia-se na ligação do corante (Coomassie Brilliant Blue /G-250) com moléculas de proteínas da amostra, formando um complexo de cor azul. Os dados obtidos da quantificação proteica foram utilizados nos cálculos das outras variáveis bioquímicas analisadas. Nas amostras em que foi utilizado leite em pó, descontou-se a proteína exclusiva do leite, através da leitura em espectrofotômetro de uma amostra contendo somente o leite em pó diluído no extensor.

2.9.2. Peroxidação lipídica

O teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizado com base no protocolo de Buege e Aust [29], com algumas modificações, esse teste leva em consideração a reação de duas moléculas de TBA com uma de ácido tricloroacético (TCA) que gera uma cor rosa que pode ser lida em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 495nm. Para a análise, 100µL da amostra foram reagidos com 400µL de TCA (10%) e 500µL de TBA (0,67%), essa mistura foi aquecida até 96° por trinta minutos, resfriada em gelo por cinco minutos, em seguida centrifugada novamente por trinta minutos a 13500rpm (4°C), e lida em espectrofotômetro em 595nm. Os resultados são apresentados em nmol de malondialdeído (MDA) por mL de amostra. Juntamente com as amostras foi realizada uma curva de calibração com concentrações conhecidas de MDA (0,75, 1,5, 3, 6 e 12 nmol) para estimativa do fator de correção. Foram analisadas quatro amostras por tratamento, em duplicata.

2.9.3. Avaliação da Oxidação da Diclorofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA)

A geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) foi estimada pelo método descrito por LeBel et al. [30] utilizando H₂DCF-DA, o qual, na presença de EROs, conduz à produção de diclorofluoresceína (DCF), um produto fluorescente que pode ser quantificado por fluorimetria. A intensidade de fluorescência foi avaliada em SpectraMax® M2e Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California) utilizando excitação e emissão a 480 e 535nm,

respectivamente. Uma curva de calibração foi realizada com DCF padrão (10 μ M) e os níveis de EROs expressos como μ mol DCF/mg de proteína. As análises foram realizadas em triplicatas de amostras biológicas independentes.

2.9.4. Avaliação da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi mensurada pelo método descrito por Misra e Fridovich [31], o qual estima a dismutação do radical superóxido através da inibição da oxidação da adrenalina, em 480nm. A inibição da oxidação da adrenalina ocorre pela presença de enzima SOD na amostra, e a atividade foi indiretamente avaliada em modo cinético no leitor de microplaca SpectraMax® M2e (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California). Uma unidade (U) de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da oxidação da adrenalina, tendo atividade expressa como U SOD/mg de proteína. As análises foram realizadas em triplicatas de amostras biológicas independentes.

2.9.5. Avaliação da atividade da enzima Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada pelo método descrito por Aebi [32], o qual se baseia no decréscimo da absorvância em 240nm, em presença de H₂O₂ no meio de reação. A atividade foi avaliada em modo cinético no leitor de microplaca SpectraMax® M2e (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California). Uma unidade (U) de CAT é definida como 1 μ mol de H₂O₂ consumido por minuto, tendo a atividade expressa como U CAT/mg de proteína. As análises foram realizadas em triplicatas de amostras biológicas independentes.

2.9.6. Quantificação de grupos sulfidrílicos totais

A quantificação de grupos sulfidrílicos totais baseia-se na redução do ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico, que gera um produto amarelo (tionitrobenzoico), cuja absorvância pode ser verificada em 412nm, segundo protocolo estabelecido por Ellman [33]. O conteúdo de grupos sulfidrílicos totais correlaciona-se inversamente com o dano oxidativo em proteínas. A quantificação baseou-se em curva padrão utilizando cisteína 0,5mM como padrão, e os resultados foram expressos como nmol/mg de proteína. As análises foram realizadas em triplicatas de amostras biológicas independentes.

2.10. Ensaio cometa

Para a técnica de ensaio cometa alcalino foi utilizado o método previamente descrito por Singh et al. [34] com algumas adaptações. Primeiramente, lâminas histológicas foram lavadas com detergente, secas em estufa e limpas com etanol, em seguida recobertas com uma camada de agarose (1,5%) com ponto de fusão normal (NMP). As amostras (50 μ L) foram misturadas com 110 μ L de agarose com baixo ponto de fusão e depositadas sobre as lâminas pré-recobertas com agarose NMP. Posteriormente as lâminas foram deixadas em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, TRIS 10 mM) *over-night*. Para o controle positivo foi utilizado 10 μ L de peróxido de hidrogênio (100 μ M) em 190 μ L da amostra, incubado a 4°C por 10 minutos. Em seguida as lâminas passaram por uma etapa de vinte minutos de desenrolamento alcalino, com solução de NaOH (0,3 M) e EDTA (1 mM), pH 10. Posteriormente essas lâminas foram submetidas à eletroforese por vinte minutos, em 1V/cm e 300mA. Em seguida foi realizado uma etapa de neutralização das lâminas com TRIS (0,4 M), pH 7,5, e uma etapa de fixação das lâminas com etanol 100%. Ao final, as lâminas foram coradas com solução de brometo de etídeo, e analisadas em microscópio de epifluorescência (Axio Imager A2, Carl Zeiss) com filtro de 605nm, com o software Comet Imager 2.2 da Metasystem®.

Dentre todas as variáveis que o software analisa, escolhemos o % de DNA na cauda do cometa, comprimento da cauda do cometa (μ m), Tail Moment e Olive Tail Moment, por serem os principais parâmetros de análise de danos no DNA do cometa utilizados na literatura. O Olive Tail Moment é o principal índice de dano ao DNA [35], é o produto do % de DNA na cauda e da distância mediana da migração que se dá pela distância entre o centro de gravidade da cabeça do cometa e o centro de gravidade da cauda do cometa [36]. O comprimento da cauda do cometa é a distância máxima que o DNA danificado migra do centro do núcleo da célula até a ponta da cauda. A % de DNA na cauda é o DNA total que migra do núcleo para a cauda do cometa. O Tail Moment é o produto do comprimento da cauda e a porcentagem de DNA da cauda, o que fornece uma medida mais integrada do dano geral ao DNA na célula [35–37]. Foram analisados 100 cometas por lâmina. Foram analisadas nove lâminas por tratamento.

2.11. Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram submetidos a análise de homogeneidade (teste de Levene) e testes de normalidade (Shapiro Wilk, Kolmogorov Smirnov ou D'Agostino & Pearson). Normalização dos dados em logaritmo foi realizada quando necessário. Posteriormente aplicou-se análise de variância (ANOVA) de uma via sobre os resultados nos grupos criopreservados, e quando observado diferença significativa foi aplicado o teste de comparação de médias de Tukey. Para os dados não paramétricos aplicou-se análise de Kruskal Wallis, e quando observado diferença significativa entre os tratamentos aplicou-se o teste de Dunn. Realizou-se análise de variância de três vias (Three-Way ANOVA) para avaliar o efeito de cada componente das soluções crioprotetoras e suas interações, levando em consideração o efeito do crioprotetor permeável, o efeito do crioprotetor não permeável, o efeito do extensor, e as interações entre os fatores (permeável*não permeável; permeável*extensor; não permeável*extensor; permeável*não permeável*extensor). Todos os testes foram realizados considerando uma significância de 5%. Os dados estão apresentados como média e desvio padrão. As análises estatísticas e confecção dos gráficos foram realizadas com auxílio do software Graphpad Prism 7.0.

Com o objetivo de avaliar de maneira mais abrangente o conjunto de dados obtidos nos tratamentos FG, FH, SC1, SC2, SC4, SC5, SC6, SC7 e SC8 e ver o comportamento das respostas através dos parâmetros avaliados nos sêmen, esses dados foram tabulados e o conjunto de dados foi usado para fazer a análise de componentes principais (PCA), o que permite redução de dimensionalidade dos dados, realizando uma combinação linear e rejeitando uma parte das componentes com a menor variação. A análise de PCA foi executada por meio do software R.

3. Resultados:

Os resultados da análise qualitativa do sêmen de zebrafish após processo de criopreservação podem ser observados na Figura 1. Não foi observado diferença entre as diluições nos extensores HBSS e Ginsburg sobre os resultados observados de taxa de motilidade, tempo de motilidade, percentual de espermatozoides com morfologia normal, viabilidade e integridade de membrana, demonstrando que os resultados observados após o processo de criopreservação ocorreram devido aos efeitos dos crioprotetores e do congelamento/descongelamento das amostras. Não houve diferença significativa entre os grupos criopreservados para as variáveis de motilidade

espermática ($p=0,8110$; Figura 1A) e para o tempo de motilidade ($p=0,9893$; Figura 1B).

Observamos diferença ($p=0,0055$) entre os grupos criopreservados para o percentual de viabilidade (Figura 1C), sendo que os tratamentos SC3 ($47,6\pm 7,2\%$), SC4 ($46,4\pm 9,6\%$), SC7 ($47,8\pm 11,6\%$) e SC8 ($47,6\pm 10,4\%$), ambos com leite em pó desnatado na composição das soluções, apresentaram maiores valores de viabilidade que o tratamento SC1 ($24,6\pm 6,6\%$), que não diferiu estatisticamente dos demais.

Houve diferença ($p<0,0001$) entre os tratamentos criopreservados para a integridade de membrana (Figura 1D), os tratamentos SC4 ($60\pm 10,6\%$), SC7 ($55,6\pm 8,1\%$) e SC8 ($60\pm 11,2\%$) apresentaram maior % de espermatozoides com membrana íntegra que os grupos SC1 ($20,5\pm 7,6\%$) e SC5 ($29,3\pm 15,6\%$).

Para o percentual de espermatozoides com morfologia normal (Figura 1E), foi observado diferença ($p<0,0001$) entre os tratamentos criopreservados, onde os grupos SC3 ($34,2\pm 4,9\%$), SC4 ($35,7\pm 2,6\%$) e SC7 ($32,5\pm 2,6\%$), ambos com leite em pó desnatado na composição, apresentaram maior % de espermatozoides com morfologia normal que os grupos SC5 ($25,6\pm 2,1\%$) e SC6 ($25,8\pm 3,9\%$).

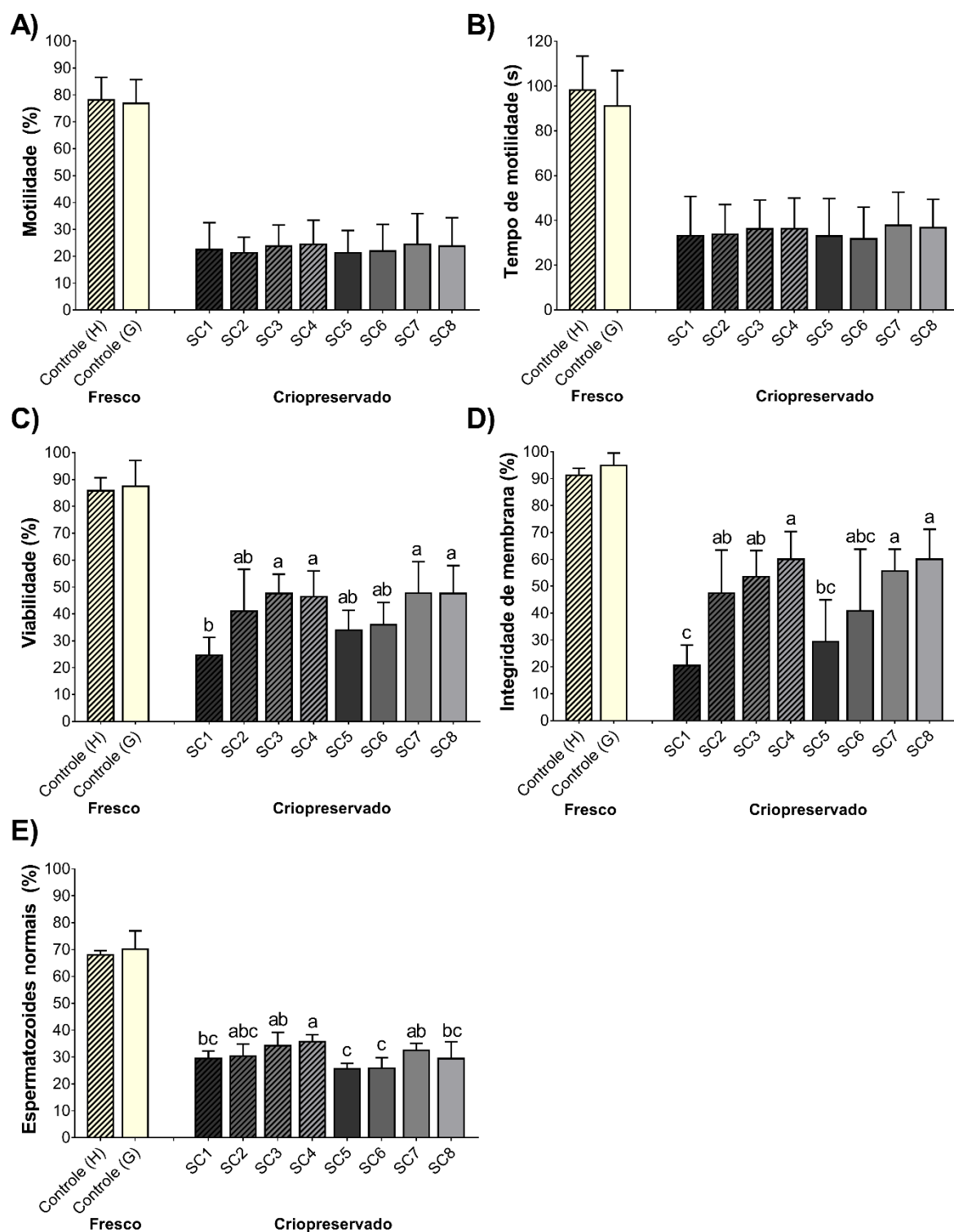


Figura 1. Características qualitativas de espermatozoides de zebrafish após a criopreservação. A) Motilidade (%); B) Tempo de motilidade; C) Viabilidade (%); D) Integridade de membrana (%); E) Espermatozoides normais (%). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos criopreservados pela ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.

O resultado da análise de patologia espermática de zebrafish criopreservados com diferentes soluções crioprotetoras podem ser observados na Tabela 2. A diluição do sêmen nos extensores HBSS e Ginsburg não teve efeito sobre o percentual de patologias espermáticas no sêmen fresco. Observou-se que de maneira geral, o processo de criopreservação aumentou o percentual de patologias espermáticas observadas no sêmen de zebrafish, em especial para as patologias de cauda enrolada, gota proximal, cabeça degenerada e cabeça solta, que apresentaram um aumento acentuado de seus percentuais após a criopreservação, independente da solução crioprotetora utilizada. De maneira geral, é difícil identificar os efeitos das soluções crioprotetoras sobre o aumento da incidência de alguma patologia espermática específica pois não foi possível observar um padrão de resposta parecido entre soluções que continuam algum componente da mesma solução crioprotetora. Contudo, podemos observar que as soluções crioprotetoras SC1, SC5 e SC6 apresentaram os maiores valores de percentual de patologias em pelo menos cinco das dez patologias observadas, apresentando um maior efeito prejudicial sobre a morfologia dos espermatozoides em comparação as outras soluções crioprotetoras.

Tabela 2. Patologias espermáticas de espermatozoides de zebrafish após criopreservação com diferentes tratamentos.

Tratamentos	Variáveis (%)									
	MAC	MIC	CDEG	SCOL	GD	GP	CQ	CC	CE	CD
<i>Sêmen fresco diluído</i>										
FH	2,4±0,8	3,3±1,7	2,8±1,9	3,4±1,4	5,6±2,4	2,08±1,1	4,2±0,9	2±1,1	1,8±1,1	3,7±1,8
FG	2,4±2,4	4,6±2,2	2±1,3	3,8±3,2	4,4±2,6	3,4±2,3	3,7±1,3	1,8±0,8	1±0,8	2,8±1,3
Valor de p	0,2953 ^{##}	0,1535 [#]	0,3047 [#]	0,7241 [#]	0,2895 [#]	0,4645 [#]	0,3428 [#]	0,6367 [#]	0,0706 [#]	0,3841 ^{##}
<i>Grupos criopreservados</i>										
SC1	7,4±1,3abc	4,1±1,1b	11,8±1,8a	11,1±1,3b	3±1,3bc	9,8±1,6b	5±2,1abc	4,1±1,1abc	12±1,6a	2,2±0,8d
SC2	4,5±2,5d	10,3±3,5a	7,1±3,9bcd	7,6±1,6d	9,9±3,2a	7,6±1,1cd	9,6±2,8a	3,5±1,4bc	6,7±1,9d	2,8±1,1cd
SC3	5,4±1,9cd	5±1,8b	6,7±1,9cd	12,7±2,9ab	3±1,5bc	6,1±0,9d	8,6±2,9ab	3,3±1,2bc	10,5±2,1abc	4,5±1,6bc
SC4	5,7±1,4bcd	6,4±1,5b	4±1,6d	9,2±1,1cd	6,5±2,1ab	6,8±0,9cd	6,3±2,6abc	2±1,3c	11,6±2,5ab	5,8±2,2ab
SC5	7,4±1,7abc	9,9±2,4a	6,8±1,6cd	10,4±1,8bc	7,8±2,8a	6,1±1,2d	3,6±1,4c	5,2±1,4ab	9,7±3,3abc	7,5±0,5a
SC6	5,2±1,9bcd	11,4±2,6a	10,2±2,5ab	13,4±1,7a	5,5±1,8abc	6,8±1,9cd	4,3±1,6bc	6,4±2,8a	8,1±2,7cd	2,9±1,4cd
SC7	8,2±1,9a	4±1,9b	10,4±1,7ab	13,2±2,1a	3,1±1,4bc	8,6±1,8bc	3,5±1,6c	4,9±1,5ab	7,9±2,1cd	3,7±1,5cd
SC8	9,3±2,1a	4,5±2,1b	8,4±2,8bc	12,9±2,6ab	2,6±1,4c	12±1,4a	3,1±2,3c	5,5±1,4ab	8,6±2,4bcd	3,7±1,8cd
Valor de p	<0,0001 [*]	<0,0001 [*]	<0,0001 [*]	<0,0001 [*]	<0,0001 ^{**}	<0,0001 [*]	<0,0001 ^{**}	<0,0001 [*]	<0,0001 [*]	<0,0001 [*]

FH: Sêmen Fresco diluído em HBSS; FG: Sêmen Fresco diluído em Ginsburg; MAC: Macrocefalia; Mic: Microcefalia; CDEG: Cabeça Degenerada; SCOL: Cabeça Solta; GD: Gota Distal; GP: Gota Proximal; CQ: Cauda Quebrada; CE: Cauda Enrolada; CD: Cauda Dobrada; CC: Cauda curta. *Valores de média±SD seguidos de letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença entre os tratamentos criopreservados pela ANOVA, seguido do teste de Tukey. **Valores de média±SD seguidos de letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença entre os tratamentos criopreservados pela análise de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. #Valores de média±SD seguidos de letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença entre o sêmen fresco (Diluído em HBSS X Diluído em Ginsburg), pelo teste T-Student. ##Valores de média±SD seguidos de letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença entre o sêmen fresco (Diluído em HBSS X Diluído em Ginsburg), pelo teste de Mann-Whitney.

Os resultados das análises bioquímicas de estresse oxidativo podem ser observados na Figura 2. Para os resultados do teste de substâncias reativas ao ácido Tiobarbitúrico (TBARS), não houve diferença entre os níveis de peroxidação lipídica dos tratamentos com o sêmen fresco diluído em HBSS ou Ginsburg ($p=0,9161$), e também não foi observado diferença ($p=0,2052$) entre os grupos criopreservados (Figura 2A), demonstrando que as diferentes soluções crioprotetoras não

influenciaram na peroxidação lipídica no sêmen após o descongelamento das amostras.

Para quantificação da geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) através da avaliação da oxidação da Diclorofluoresceína diacetato (DCF), houve diferença ($p=0,0188$) entre os grupos de sêmen fresco e diluído, onde o sêmen diluído na solução de Ginsburg apresentou maior geração de EROs em comparação com o sêmen diluído em HBSS. Foi observado diferença ($p<0,0001$) entre os grupos criopreservados, sendo que a solução SC4, contendo HBSS, metanol e leite em pó desnatado, promoveu a menor geração de EROs após o processo de criopreservação, enquanto o sêmen criopreservado com a solução contendo Ginsburg e metanol, apresentou a maior geração de EROs entre os tratamentos criopreservados (Figura 2B).

A atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) foi diferente ($p<0,0001$) entre os grupos de sêmen fresco e diluído, onde o sêmen diluído na solução de Ginsburg apresentou maior atividade da enzima SOD em comparação com o sêmen diluído em HBSS. Entre os grupos criopreservados, houve diferença entre os tratamentos ($p<0,0001$), sendo que o grupo criopreservado com a solução SC4 apresentou a maior atividade de SOD, enquanto a menor atividade foi observada no sêmen criopreservado com a solução SC1, que não diferiu estatisticamente dos grupos SC2 e SC6 (Figura 2C).

A atividade da enzima Catalase (CAT) foi diferente ($p<0,0001$) entre os grupos de sêmen fresco e diluído, onde o sêmen diluído na solução de Ginsburg apresentou maior atividade da enzima CAT em comparação com o sêmen diluído em HBSS. Entre os grupos criopreservados houve diferença entre os tratamentos ($p<0,0001$), os maiores valores observados foram nos tratamentos SC7 e SC8 e os menores valores foram observados nos tratamentos SC1, SC2, SC3 e SC6 (Figura 2D).

Para a análise de quantificação de grupos sulfidrílicos totais (Grupos Sulfidrilas) que se correlaciona inversamente com o dano oxidativo em proteínas, observou-se diferença ($p=0,0002$) entre os grupos de sêmen fresco e diluído, onde o sêmen diluído na solução de HBSS apresentou maior valor de grupos sulfidrílicos totais em comparação com o sêmen diluído em solução de Ginsburg. Foi observado diferença ($p<0,0001$) entre os tratamentos criopreservados, sendo o maior valor observado no grupo SC8 e o menor no grupo SC6, ambos contendo Ginsburg e metanol, porém o SC8 é composto também pelo leite em pó desnatado (Figura 2E).

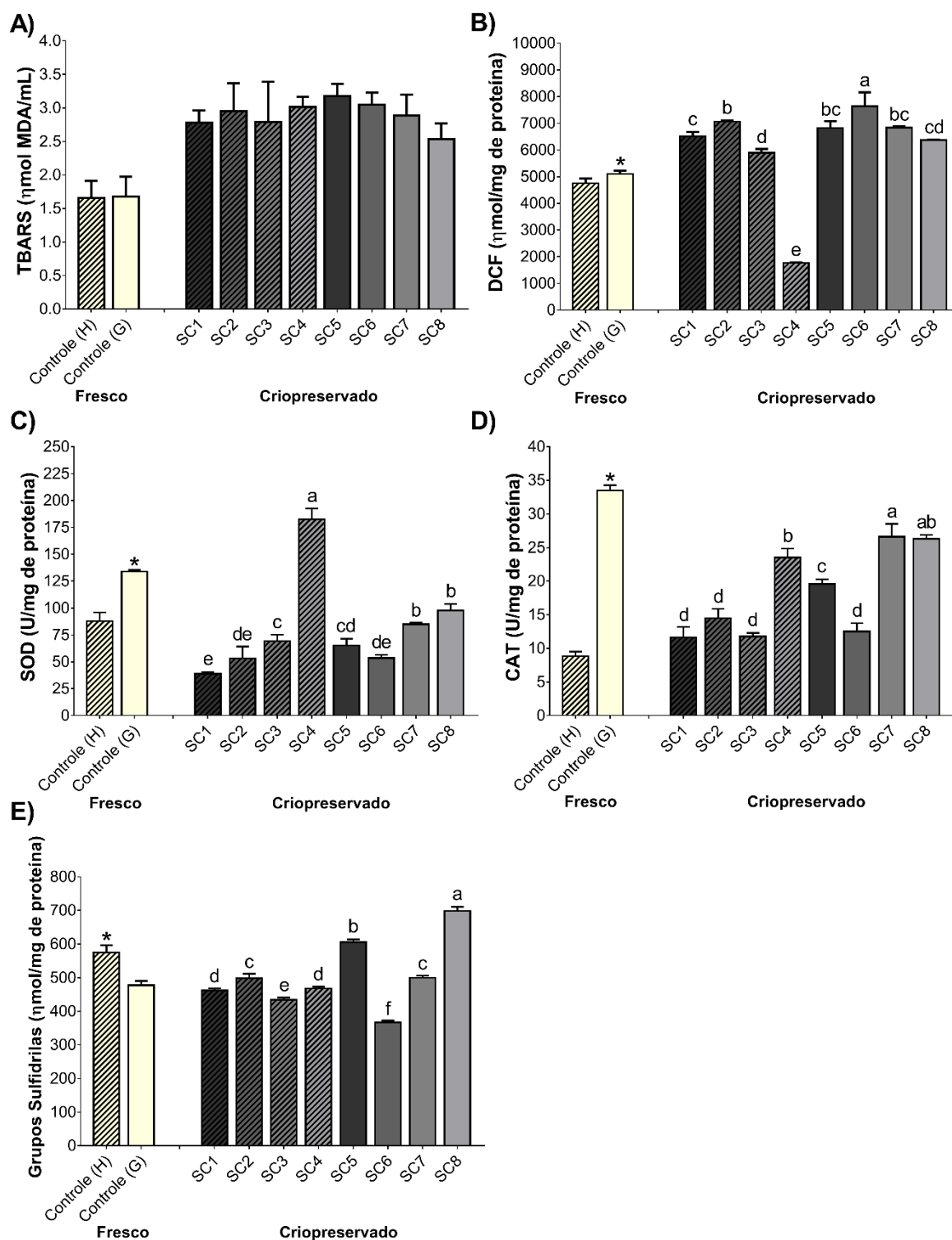


Figura 2. Dados bioquímicos de estresse oxidativo e peroxidação lipídica em sêmen de zebrafish após a criopreservação. A) Teste de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico - TBARS (nmol de MDA/mL); B) Avaliação da Oxidação da Diclorofluoresceína diacetato (H_2DCF -DA) - DCF (nmol/mg de proteína); C) Avaliação da atividade da enzima Superóxido Dismutase - SOD (U/mg de proteína); D) Avaliação da atividade da Catalase - CAT (U/mg de proteína); E) Quantificação de grupos

sulfidrílicos totais - Grupos Sulfidrilas (nmol/mg de proteína). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos criopreservados pela ANOVA, seguido de teste de Tukey. *Indica diferença entre os grupos controle (Fresco diluído em HBSS X Fresco diluído em Ginsburg), pelo teste T-Student.

Os resultados da avaliação dos danos ao DNA realizado através do Ensaio Cometa podem ser observados na Figura 3. Foram escolhidos os parâmetros de avaliação de dano ao DNA mais utilizados na literatura. Por meio de análise objetiva por software avaliou-se o % de DNA na cauda do cometa, o comprimento da cauda do cometa, o Tail Moment e Olive Tail Moment. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi utilizado como controle positivo da análise e se apresentou entre os maiores valores de danos em todas as variáveis testadas, demonstrando a validação do teste. Os grupos com o sêmen fresco e diluído em diferentes extensores (HBSS e Ginsburg) não diferiram entre si para nenhuma das variáveis observadas, mostrando que o extensor utilizado não influenciou nos danos ao DNA.

O % de DNA na cauda do cometa foi diferente ($p < 0,0001$) entre os tratamentos criopreservados (Figura 3A), onde o tratamento criopreservado com a solução SC4 apresentou o menor % de DNA na cauda do cometa, enquanto o grupo criopreservado com a solução SC8 apresentou o maior % de DNA na cauda, não diferindo estatisticamente dos grupos SC1, SC2, SC5 e SC6, sendo os grupos com maiores danos ao DNA.

Observou-se diferença ($p < 0,0001$) entre os tratamentos criopreservados para o comprimento da cauda do cometa (Figura 3B). Assim como no % de DNA na cauda, o grupo criopreservado com a solução SC4 apresentou o menor valor observado, porém não diferindo do grupo SC7, sendo os tratamentos os que apresentaram os menores danos ao DNA. Os tratamentos criopreservados com as soluções SC1, SC2, SC5 e SC6, ambas sem o leite em pó desnatado na composição, apresentaram os maiores comprimentos de cauda do cometa, apresentando dessa forma os maiores danos ao DNA.

Para as variáveis Tail Moment (Figura 3C) e Olive Tail Moment (Figura 3D), observou-se diferença ($p < 0,0001$) entre os tratamentos em ambas as variáveis, e um comportamento similar entre os grupos experimentais. Houve um menor dano ao DNA nos grupos criopreservados com as soluções SC3, SC4, SC7 e SC8 em ambas variáveis, destacando-se mais uma vez que a presença do leite em pó desnatado

como crioprotetor não permeável nas soluções crioprotetoras ofereceu maior proteção aos danos de DNA.

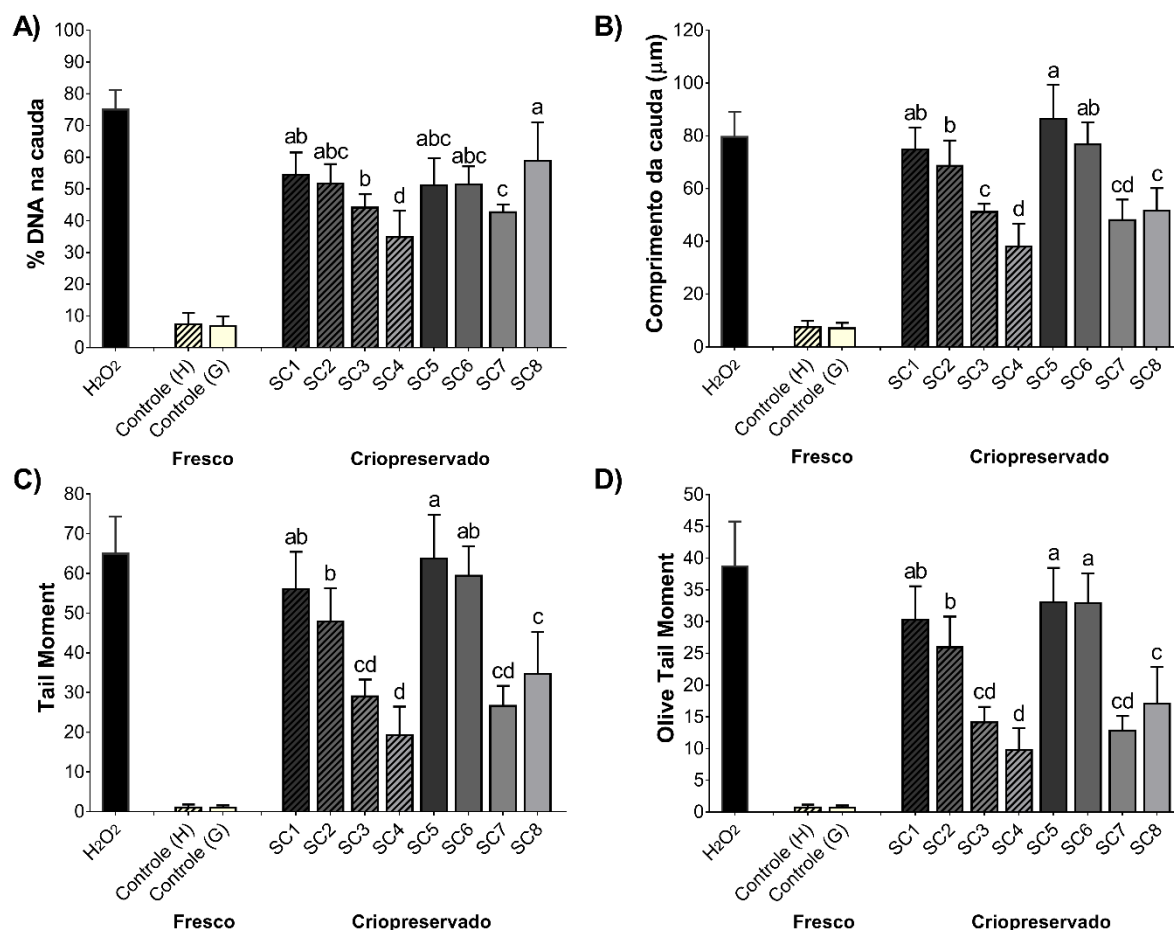


Figura 3. Variáveis objetivas do Ensaio Cometa Alcalino. Danos ao DNA em espermatozoides de zebrafish após a criopreservação. A) % de DNA na cauda do cometa; B) Comprimento da cauda do cometa (μm); C) Tail Moment; D) Olive Tail Moment. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos criopreservados pela ANOVA, seguido pela comparação de médias do teste de Tukey.

A análise de variância de três vias realizada com as variáveis respostas de qualidade do sêmen após a criopreservação demonstrou efeito significativo dos principais componentes das soluções crioprotetoras, em especial da utilização ou não de crioprotetor não permeável na solução que apresentou efeito significativo em 11 das 14 principais variáveis respostas analisadas. Entre as interações entre os principais componentes das soluções crioprotetoras, a interação entre o crioprotetor permeável e o extensor demonstrou ser mais significativa sobre as variáveis

respostas, apresentando efeito significativo em sete das 14 variáveis respostas analisadas (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito do crioprotetor permeável, crioprotetor não permeável, extensor e suas interações na qualidade do sêmen de zebrafish após a criopreservação.

Three-way ANOVA (Valor de p<0,05)	Permeável	Não permeável	Extensor	Permeável*Não permeável	Permeável*Extensor	Não permeável*Extensor	Permeável*Não permeável*Extensor
Motilidade (%)	0,9466	0,3176	0,9466	0,9466	0,9466	0,9466	0,7380
Tempo de motilidade (s)	0,9186	0,3013	>0,9999	0,9864	0,8381	0,7723	0,9593
Viabilidade (%)	0,1874	0,0002	0,6489	0,1265	0,2963	0,8136	0,2313
Espermatozoides normais (%)	0,8876	<0,0001	<0,0001	0,4460	0,1369	0,8876	0,2721
Integridade de membrana (%)	<0,0001	<0,0001	0,7176	0,0224	0,1464	0,9832	0,2635
DCF (nmol/mg de proteína)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
SOD (U/mg de proteína)	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
CAT (U/mg de proteína)	0,0004	<0,0001	0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,2339
Sulfidrilas (nmol/mg de proteína)	0,0207	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
TBARS (nmol de MDA/mL)	0,8502	0,1207	0,8166	0,7100	0,0647	0,0647	0,5434
% de DNA na cauda	0,5247	0,0001	0,0081	0,1782	0,0001	0,0004	0,0020
Comprimento da cauda do cometa (µM)	0,0030	<0,0001	0,0005	0,4286	0,1127	0,2810	0,0172
Tail Moment	0,0728	<0,0001	<0,0001	0,1727	0,0070	0,4384	0,0750
Olive Tail Moment	0,2788	<0,0001	0,0004	0,3069	0,0032	0,3781	0,3041

1º Coluna: Variáveis resposta; 2º Coluna: Efeito do crioprotetor permeável; 3º Coluna: Efeito do crioprotetor não permeável; 4º Coluna: Efeito do extensor; 5º Coluna: Interação entre crioprotetor permeável e não permeável; 6º Coluna: Interação entre crioprotetor permeável e extensor; 7º Coluna: Interação entre crioprotetor não permeável e extensor; 8º Coluna: Interação entre crioprotetor permeável, não permeável e extensor. Valores de p em negrito na tabela indicam efeito significativo (p<0,05).

Na Figura 4A é mostrado os scores da análise de componentes principais (PCA biplot com elipse com grau de confiança de 66%), dos dois primeiros componentes (PC1 e PC2), revelando a projeção de das observações utilizadas na análise. Os dois primeiros eixos (PC1 e PC2) foram responsáveis por 53,9% da variabilidade no

comportamento dos espermatozoides criopreservados (39,4 e 14,5%, respectivamente). O *eigenvalue* estimado para o primeiro componente principal (PC1) foi de 8,28 e compreendeu 39,4% da variação no conjunto de dados, enquanto o segundo (PC2) teve um valor de 3,04, representando 14,5%. Embora não apresentado na Figura 4A, o *eigenvalue* para o terceiro componente principal (PC3) teve um valor de 2,18 representando 10,37% da variação.

As elipses traçadas para cada tratamento experimental mostraram separação para SC4, SC3, SC2 e SC6. Houve *overlap* nos tratamentos FG e FG formando um grupo distinto dos outros tratamentos. Situação similar ocorreu com os tratamentos SC7-SC8 e SC5-SC1. Conforme é visto na Figura 4A, os tratamentos criopreservados que mais se aproximaram das características dos tratamentos com o sêmen fresco diluído (FG e FH), foram os SC2, SC3, SC4, SC7 e SC8.

Na Figura 4B é mostrado as projeções mútuas dos *loadings* dos vetores, mostrando um padrão de correlação entre as variáveis avaliadas. Os *loadings* do PC1 indicaram que as seguintes variáveis: Comprimento da cauda (0,92), % de DNA na cauda do cometa (0,84), Cabeça degenerada e Tail Moment Olive (0,74), Tail Moment e Cabeça Solta (0,71), Gota proximal e Cauda curta (0,61), Macrocefalia (0,58) e DCF (0,53) contribuíram positivamente, enquanto percentual de espermatozoides normais (-0,87), viabilidade (-0,86), integridade de membrana (-0,76), SOD (-0,69) e CAT (-0,26) influenciaram negativamente o PC1. O PC2 mostrou os maiores *loadings* para Macrocefalia (0,59) e CAT, Gota proximal (0,57), SOD (0,52). Por outro lado, Tail Moment (-0,55), Tail Moment Olive (-0,54) e DCF (-0,35) influenciaram negativamente para PC2.

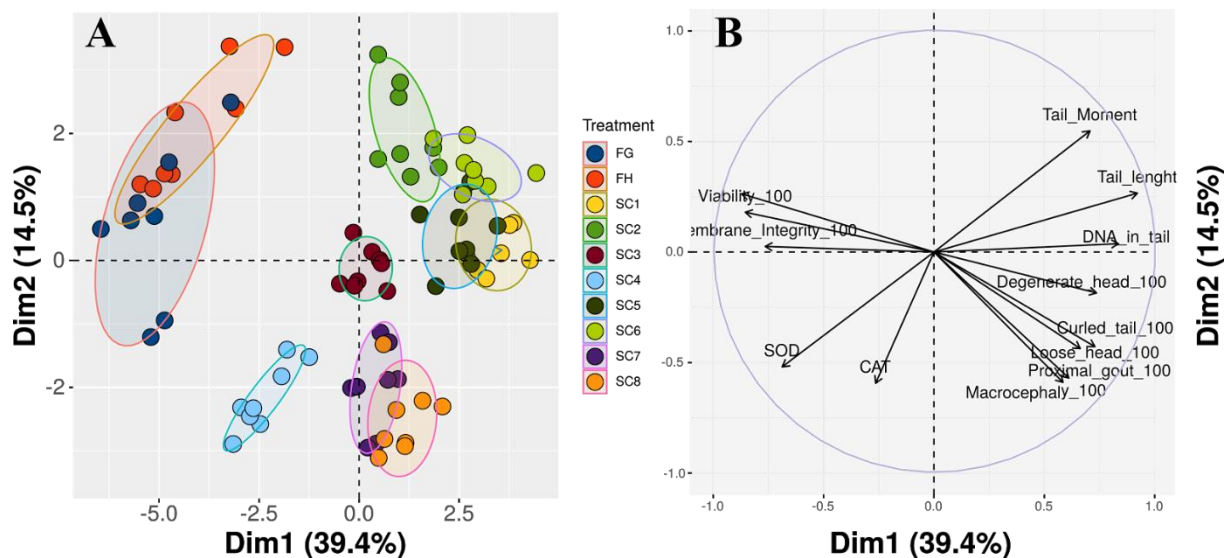


Figura 4. Análise de Componentes Principais (PCA). A) Gráficos de dispersão dos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) para as variáveis analisadas no sêmen fresco e diluído (HBSS e Ginsburg) e nos diferentes grupos criopreservados. B) As setas marcadas mostram os *loading* dos parâmetros dos tratamentos apresentados nos eixos PC1 e PC2. para todos as variáveis analisadas no sêmen fresco e diluído (HBSS e Ginsburg) e nos diferentes grupos criopreservados.

4. Discussão:

Sabe-se que a criopreservação pode gerar diversos tipos de danos as células espermáticas, e que nem sempre análises mais diretas da funcionalidade dos espermatozoides comumente utilizadas, como motilidade e fertilidade, podem dar uma visão global dos danos causados pela criopreservação. Uma abordagem mais ampla na avaliação dos efeitos da criopreservação nos espermatozoides oferece informações essenciais para aumentar o entendimento de como as células são afetadas durante o processo e podem indicar de maneira mais clara as estratégias que devem ser tomadas para otimizar os protocolos de criopreservação. Dessa forma procuramos utilizar uma abordagem ampla dos efeitos da criopreservação sobre espermatozoides de zebrafish, utilizando variáveis de funcionalidade, viabilidade, morfologia e integridade, estresse oxidativo e danos ao DNA.

A análise de motilidade espermática é muito utilizada para comparar diferentes condições experimentais e geralmente se correlaciona com a fertilidade [38,39]. Observamos uma queda acentuada da taxa de motilidade espermática e do tempo de motilidade após a criopreservação. Por outro lado, independente do extensor utilizado não houve alteração para esses parâmetros, apresentando 78,13% e 98,25s no

sêmen diluído em HBSS, enquanto o sêmen diluído em Ginsburg apresentou 76,88% e 91,13s.

Os grupos criopreservados não foram diferentes entre si tanto para taxa de motilidade quanto para o tempo de motilidade, apresentando valores de motilidade entre 21,25% a 24,38%, que de um modo geral situaram-se em médias intermediárias quando comparados a resultados de outros estudos. Neste caso, a motilidade espermática observada no presente estudo foi similar aos resultados obtidos com o protocolo de Matthews et al. [14], que obteve motilidade de 20,1% utilizando o extensor E400 e a solução crioprotetora RMMB (20% de Rafinose pentahidratada; 2,5% de leite em pó desnatado; 6,67% de metanol e 30mM de Bicina tamponada) e os resultados de Diogo et al. [15] que apresentaram motilidade entre 20 e 25% utilizando HBSS e 10% de DMF como crioprotetor permeável, e realizando a criopreservação em ultrafreezer com taxa de resfriamento de $-66^{\circ}\text{C}/\text{min}$. A motilidade espermática do presente estudo foi menor que a observada por Harvey et al. [5] que obtiveram motilidade média de 43% utilizando Ginsburg, 10% de metanol e 15% de leite em pó na solução crioprotetora, Bai et al. [12], com motilidade média de 46,8% utilizando HBSS e 8% de DMSO como crioprotetor permeável e Yang et al. [8] que utilizaram como solução crioprotetora o HBSS e 8% de metanol. Por outro lado, Morris et al. [7] observaram menores valores de motilidade espermática que o presente estudo, obtendo motilidade média de 11,6% utilizando HBSS e 15% de DMA como crioprotetor permeável. Quanto ao tempo de motilidade máximo observado no presente estudo, esse não passou dos 100 segundos, inferior ao relatado por Wilson-Leedy et al. [23], que observaram espermatozoides móveis até os 147 segundos, mesmo utilizando o mesmo método de ativação de motilidade com solução de 80mM de NaCl. Como podemos observar, a variação das respostas obtidas entre os diferentes estudos é evidente, podendo ser resultado das diferentes metodologias aplicadas (avaliação subjetiva ou CASA), ou até mesmo da variação genética (diferentes linhagens utilizadas nos trabalhos) e de condição dos animais, como demonstrado pelo trabalho de Yang et al. [8], que observou que a animais com diferentes fator de condição corporal apresentavam resultados de motilidade após o descongelamento das amostras diferentes. Além disso, a alimentação dos animais e sistemas de criação utilizados em cada laboratório pode afetar diretamente nas condições dos animais, desenvolvimento gonadal e qualidade espermática.

Uma das maneiras mais práticas para testar o sucesso de um protocolo de criopreservação é a análise da integridade e permeabilidade da membrana celular dos espermatozoides [40], pois a integridade da membrana plasmática é afetada pela taxa de resfriamento, tipo de extensor, crioprotetor e suas interações durante o processo de criopreservação, sendo portanto, um fator chave para avaliar a qualidade dos espermatozoides [9]. De maneira geral a utilização de corantes fluorescentes foi mais sensível na detecção de danos de membrana em relação ao uso da técnica com corante Eosina-Nigrosina, detectando em média 5,54% a mais de danos na membrana.

Como esperado, os danos causados pelo processo de criopreservação diminuíram o % de membranas íntegras e viabilidade nos espermatozoides. Diferentemente da análise de motilidade, a integridade de membrana e viabilidade foram diferentes entre os grupos criopreservados, sendo possível observar que as soluções crioprotetoras com leite em pó desnatado apresentaram maior integridade da membrana. A combinação do DMSO apenas com o extensor, sem o leite em pó, resultou em baixa viabilidade e altos níveis de danos as membranas plasmáticas dos espermatozoides, demonstrando a necessidade do uso do crioprotetor não permeável para aumentar a viabilidade pós descongelamento. Crioprotetores não permeáveis, são capazes de estabelecer interações com bicamadas lipídicas da membrana e proteger as células durante o congelamento [41]. Dados relativos ao processo de criopreservação do sêmen de camundongo demonstraram que o melhor resultado foi alcançado suspendendo-os em soluções contendo rafinose ou leite desnatado [42].

Existem semelhanças estruturais e morfológicas entre os espermatozoides de zebrafish e outras espécies de ciprinídeos [43]. As células espermáticas sofrem troca osmótica com os extensores, podendo resultar em alterações na membrana plasmática, como expansão ou retenção da membrana [9], podendo resultar em alterações morfológicas. Entre os grupos criopreservados, os resultados apresentaram a mesma tendência que observamos na avaliação de integridade de membrana, onde os espermatozoides criopreservados com soluções crioprotetoras contendo leite em pó desnatado apresentaram de maneira geral, maiores valores de espermatozoides com morfologia normal. O leite em pó é utilizado na solução crioprotetora para proteger a cauda dos espermatozoides, diminuindo a aglutinação da comum aos espermatozoides de zebrafish e acredita-se que tenha um efeito protetor durante a criopreservação [14]. Com relação aos espermatozoides que não

apresentaram morfologia normal, no presente estudo foi notável o aumento de patologias espermáticas, em especial para as patologias de cauda enrolada, gota proximal, cabeça degenerada e cabeça solta, após a criopreservação. O grupo experimental SC5 esteve entre os maiores % em 6 das 10 patologias encontradas, demonstrando mais uma vez que o uso do DMSO isolado como crioprotetor causa maiores danos as células espermáticas.

O estresse oxidativo reflete um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) de um sistema biológico e a capacidade do organismo de neutralizar essas EROs por meio de antioxidantes, desempenhando um papel importante ao dano espermático durante a criopreservação [13].

A peroxidação lipídica analisada pelo teste de TBARs, aumentou após a criopreservação no sêmen do zebrafish em todas as soluções crioprotetoras testadas. Os espermatozoides são particularmente suscetíveis a peroxidação lipídica [13], pois contém altas concentrações de ácidos graxos insaturados [44]. O conhecimento sobre a composição de ácidos graxos do sêmen de zebrafish é relativamente baixo, contudo, as células espermáticas da espécie já demonstraram ser sensíveis aos efeitos da peroxidação lipídica e dos radicais livres de oxigênio [17]. Como consequência da peroxidação lipídica, a membrana plasmática perde a integridade e fluidez necessárias, perdendo importantes moléculas de sinalização necessárias para o sucesso da fertilização [14,45].

O excesso de produção de EROs está associado à diminuição da motilidade e fertilidade, e aumento das anormalidades morfológicas e fragmentação de DNA [46]. No presente estudo medimos a produção de EROs através da técnica de oxidação da diclorofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA), que oferece um valor global da produção de EROs na célula. Observamos que a criopreservação demonstrou produzir mais EROs nos espermatozoides, contudo, quando utilizamos a solução crioprotetora SC4 (HBSS + Metanol 8% + Leite em pó desnatado 15%), observamos uma queda drástica da geração de EROs. Este resultado pode ser explicado pela alta atividade da enzima SOD nesse grupo experimental, demonstrando que possivelmente a maior proteção das células pelo estresse oxidativo está relacionado a uma maior atividade da enzima SOD.

A SOD é uma das principais enzimas responsáveis pela remoção de EROs no sêmen de peixes, juntamente com a catalase (CAT) e glutathione redutase e (GSR) e glutathione peroxidase (GPx) [47]. A atuação da SOD na proteção contra EROs

acontece pela redução do dano oxidativo no tecido convertendo o $O_2^{\cdot-}$ (ânion radical superóxido) em H_2O_2 [48]. Observou-se também que os outros grupos criopreservados que tinham leite em pó desnatado em sua composição apresentaram níveis maiores de atividade da SOD, chegando a ser similar ao do sêmen fresco, demonstrando que o leite em pó desnatado ou a sinergia da proteção entre crioprotetor permeável e não permeável favorece uma maior atividade da enzima, especialmente no grupo experimental SC4.

A atividade da enzima CAT também demonstrou ser influenciada pelo uso do leite em pó desnatado na solução crioprotetora, pois os grupos experimentais SC7 e SC8, seguido do grupo SC4 apresentaram os maiores valores de CAT dos grupos criopreservados. A utilização do Ginsburg como extensor promoveu maior atividade de CAT no sêmen fresco em relação ao sêmen fresco diluído em HBSS. Até onde conhecemos não há na literatura indícios que a solução de HBSS promove a inibição da atividade da CAT, dificultando o entendimento dessa resposta. Em estudo de Hagedorn et al. [18], observou-se que a inclusão de CAT sintética à solução crioprotetora melhorou a viabilidade e motilidade dos espermatozoides após descongelamento das amostras, contudo, não diminuiu a produção de EROs nas amostras, sendo os motivos para essa resposta ainda não esclarecidos.

Os grupos sulfidrílicos totais se correlacionaram inversamente com o dano oxidativo em proteínas, ou seja, valores maiores de grupos sulfidrilas conferem maior proteção contra a oxidação de proteínas nos espermatozoides. Mais uma vez ficou evidente a importância da inclusão do leite em pó na solução crioprotetora, tendo em vista que o grupo SC8 apresentou maior valor e o SC6 o menor valor da variável, e ambas soluções são compostas de Ginsburg e metanol, a diferença entre os dois grupos foi a presença do leite em pó no grupo SC8, que promoveu um significativo aumento na produção de grupos sulfidrilas, e conseqüentemente maior proteção contra a oxidação proteica. O leite é um meio fisiológico complexo e seu mecanismo de ação durante a criopreservação não é bem conhecido [14]. Contudo, é evidente que a inclusão de leite em pó aumenta a proteção dos espermatozoides quanto aos danos causados pela criopreservação.

A integridade do DNA dos espermatozoides é de suma importância para a transmissão equilibrada de informações genéticas para as gerações futuras [49]. O ensaio cometa é a técnica mais utilizada para analisar a fragmentação de DNA em peixes [50]. Em todas as variáveis observadas no ensaio cometa, podemos observar que

o sêmen fresco apresenta um nível muito baixo de fragmentação do DNA, demonstrando que o processo de criopreservação causa danos ao conteúdo de DNA. O % de DNA na cauda do cometa encontrado no sêmen fresco diluído tanto em Ginsburg como em HBSS foi próximo de 10%, similar ao obtido por Reinardy et al. [51] que obtiveram de 9 a 12% de danos ao DNA em sêmen fresco de zebrafish, sem diluir em extensor.

Observamos que de modo geral o sêmen criopreservado com as soluções contendo leite em pó desnatado (SC3, SC4, SC7 e SC8) apresentam menores danos ao DNA que as demais soluções, chegando a apresentar cerca de metade do dano observado nas soluções que não continham o crioprotetor não permeável. Os menores valores de danos ao DNA, obtidos nos grupos experimentais contendo leite em pó, podem ser reparados, pois é possível que, dependendo da natureza ou do nível do dano, o mecanismo de reparação do oócito durante a embriogênese precoce minimize os danos de fragmentação de DNA, não afetando o desenvolvimento embrionário, mas grandes danos induzirão mudanças no desenvolvimento embrionário, reduzindo a capacidade de incubação [52].

De acordo com Kumaravel et al. [53], o percentual de DNA na cauda do cometa é o parâmetro mais recomendado para avaliação de danos ao DNA. Contudo, o comprimento da cauda do cometa, Tail Moment e Olive Tail Moment, também são variáveis recomendadas e muito utilizadas em pesquisas [54]. No presente estudo, as variáveis comprimento da cauda do cometa, Tail Moment e Olive Tail Moment demonstraram diferença mais acentuada entre os grupos experimentais, podendo indicar maior sensibilidade na avaliação de danos ao DNA em espermatozoides de zebrafish.

Para maior parte dos programas de criopreservação a fertilização é considerada o principal critério de avaliação do sucesso da criopreservação. Contudo, a fertilização *in vitro* consome tempo e recursos, além de requerer fêmeas aptas para coletas de oócitos [9], o que muitas vezes é um problema pois a própria qualidade dos oócitos pode resultar em resultados ruins de fertilização, independente da qualidade do sêmen. Dessa maneira, o desenvolvimento de ensaios eficazes, rápidos e precisos da qualidade espermática é altamente necessário para cada etapa do processo de criopreservação [9]. No presente estudo, uma análise mais ampla dos danos causados pela criopreservação em espermatozoides de zebrafish através de diversas

variáveis analisadas pôde demonstrar um padrão de respostas dos espermatozoides a diferentes crioprotetores, a interação entre crioprotetores e crio injúrias.

De um modo geral, quando avaliado as variáveis utilizando a análise dos componentes principais nos dados obtido nos tratamentos avaliados observou-se que as interações dos *loadings* nos PC1 e PC2 explicou 53,9% da variabilidade total dos dados coletados, mostrando um claro agrupamento entre os tratamentos controle com sêmen fresco diluído (FG e FH), bem como foi possível observar que os tratamentos criopreservados com leite em pó desnatado (SC3, SC4, SC7 e SC8) se aproximaram mais das características do sêmen fresco, juntamente com o tratamento SC2, que apresentou a melhor resposta entre os tratamentos que não continham leite em pó desnatado na sua composição. A análise de componentes principais é um tipo de análise exploratória que pode ajudar na visão geral de como as diversas variáveis em um experimento se comportam e no presente estudo reforçaram ainda mais os resultados obtidos na comparação entre tratamentos, corroborando com a ideia em que de forma geral o leite em pó desnatado contribuiu positivamente na proteção dos espermatozoides durante a criopreservação.

Com as análises realizadas nesse estudo, foi possível identificar que a presença do leite em pó desnatado como crioprotetor externo promoveu maior proteção aos espermatozoides durante a criopreservação, sendo especialmente importante para diminuição dos danos oxidativos e de DNA. A análise de variância de três vias aplicada para avaliar os efeitos dos diferentes componentes das soluções crioprotetoras e suas interações, corrobora a importância da utilização do leite em pó desnatado, pois o efeito do crioprotetor não permeável foi significativo na maioria das variáveis respostas analisadas, apresentando maior influência nas respostas em comparação com os outros componentes das soluções crioprotetoras. Em um recente estudo de Diogo et al. [3], o efeito do crioprotetor não permeável demonstrou ser mais significativo também, neste caso os autores mostraram efeito significativo em seis de oito variáveis respostas analisadas, enquanto o efeito do crioprotetor permeável foi significativo em apenas uma variável das oito analisadas. Apesar de não se saber ao certo o modo de ação do leite em pó durante a criopreservação, estudos indicam que as micelas de caseína (principais proteínas do leite) são os componentes ativos no leite que protegem os espermatozoides, impedindo a perda de colesterol e lipídeos das membranas celulares [55]. A sinergia obtida pela combinação de crioprotetores permeáveis e não permeáveis já se mostrou benéfica na otimização da

criopreservação de sêmen em zebrafish [3]. Dessa forma, testes de outros crioprotetores não permeáveis em conjunto com crioprotetores permeáveis ou até mesmo de forma isolada em meios crioprotetores apresentam grande potencial, tendo em vista a busca pela diminuição da toxicidade do meio crioprotetor.

5. Conclusões

Apesar de ocorrerem diferenças sutis nas combinações propostas com os extensores (Ginsburg e HBSS) e os crioprotetores permeáveis (DMSO e metanol), independente da associação entre esses componentes, o acréscimo do leite em pó desnatado produziu melhores resultados, em especial no percentual de espermatozoides normais e com membrana plasmática íntegra, na proteção contra os danos oxidativos e ao DNA. De maneira geral, pode-se sugerir a utilização de uma solução crioprotetora contendo HBSS, metanol (8%) e leite em pó desnatado (15%).

Conflito de interesses

Os autores não têm potenciais conflitos de interesse.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi apoiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

- [1] Collin J, Martin P. Zebrafish as a Research Organism: *Danio rerio* in Biomedical Research. *Basic Sci. Methods Clin. Res.*, Elsevier Inc.; 2017, p. 235–61. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00013-8>.
- [2] Kint P, Mahesh G, Panwar Y. Mapping of zebrafish research: A global outlook. *Zebrafish* 2013; 10:510–7. <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0854>.
- [3] Diogo P, Martins G, Nogueira R, Marreiros A, Gavaia PJ, Cabrita E. Cryoprotectants synergy improve zebrafish sperm cryopreservation and offspring skeletogenesis. *Cryobiology* 2019; 91:115–27. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.10.001>.
- [4] Tiersch TR, Yang H, Jenkins JA, Dong Q. Sperm cryopreservation in fish and shellfish. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 65:493–508.

- [5] Harvey B, Ashwood-Smith MJ. Cryoprotectant penetration and supercooling in the eggs of salmonid fishes. *Cryobiology* 1982; 19:29–40. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(82\)90122-5](https://doi.org/10.1016/0011-2240(82)90122-5).
- [6] Ransom DG, Zon LI. Collection, storage, and use of zebrafish sperm. *Methods Cell Biol* 1999; 60:365–72. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)61912-3](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)61912-3).
- [7] Morris JP, Berghmans S, Zahrieh D, Neuberg DS, Kanki JP, Look AT. Zebrafish sperm cryopreservation with N,N-dimethylacetamide. *Biotechniques* 2003; 35:956–68. <https://doi.org/10.2144/03355st03>.
- [8] Yang H, Carmichael C, Varga ZM, Tiersch TR. Development of a simplified and standardized protocol with potential for high-throughput for sperm cryopreservation in zebrafish *Danio rerio*. *Theriogenology* 2007; 68:128–36. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.02.015>.
- [9] Yang H, Daly J, Carmichael C, Matthews J, Varga ZM, Tiersch T. A Procedure-Spanning Analysis of Plasma Membrane Integrity for Assessment of Cell Viability in Sperm Cryopreservation of Zebrafish *Danio rerio*. *Zebrafish* 2016; 13:144–51. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1176>.
- [10] Carmichael C, Westerfield M, Varga ZM. Cryopreservation and in vitro fertilization at the zebrafish international resource center. *Methods Mol Biol* 2009; 546:45–65. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-977-2_4.
- [11] Draper BW, Moens CB. A high-throughput method for zebrafish sperm cryopreservation and in vitro fertilization. *J Vis Exp* 2009. <https://doi.org/10.3791/1395>.
- [12] Bai C, Wang X, Lu G, Wei L, Liu K, Gao H, et al. Cooling rate optimization for zebrafish sperm cryopreservation using a cryomicroscope coupled with SYBR14/PI dual staining. *Cryobiology* 2013; 67:117–23. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.05.011>.
- [13] Wang G, Kang N, Gong H, Luo Y, Bai C, Chen Y, et al. Upregulation of uncoupling protein Ucp2 through acute cold exposure increases post-thaw sperm quality in zebrafish. *Cryobiology* 2015; 71:464–71. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.08.016>.
- [14] Matthews JL, Murphy JM, Carmichael C, Yang H, Tiersch T, Westerfield M, et al. Changes to extender, cryoprotective medium, and in vitro fertilization improve

zebrafish sperm cryopreservation. *Zebrafish* 2018; 15:279–90. <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1521>.

[15] Diogo P, Martins G, Quinzico I, Nogueira R, Gavaia PJ, Cabrita E. Electric ultrafreezer (– 150 °C) as an alternative for zebrafish sperm cryopreservation and storage. *Fish Physiol Biochem* 2018; 44:1443–55. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0500-6>.

[16] Caetano Da Silva C, Kollár T, Csenki-Bakos Z, Fernandes BHV, Horvath A, Carvalho LR. An Easy Method for Cryopreservation of Zebrafish (*Danio rerio*) Sperm. *Zebrafish* 2019; 16:321–3. <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1696>.

[17] Hagedorn M, Carter VL. Zebrafish reproduction: Revisiting in vitro fertilization to increase sperm cryopreservation success. *PLoS One* 2011; 6:e21059. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021059>.

[18] Hagedorn M, McCarthy M, Carter VL, Meyers SA. Oxidative Stress in Zebrafish (*Danio rerio*) Sperm. *PLoS One* 2012; 7:e39397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039397>.

[19] Elliott GD, Wang S, Fuller BJ. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology* 2017; 76:74–91. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.04.004>.

[20] Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984;247. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.c125>.

[21] Matthews M, Varga ZM. Anesthesia and euthanasia in zebrafish. *ILAR J* 2012; 53:192–204. <https://doi.org/10.1093/ilar.53.2.192>.

[22] Jing R, Huang C, Bai C, Tanguay R, Dong Q. Optimization of activation, collection, dilution, and storage methods for zebrafish sperm. *Aquaculture* 2009; 290:165–71. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.02.027>.

[23] Wilson-Leedy JG, Kanuga MK, Ingermann RL. Influence of osmolality and ions on the activation and characteristics of zebrafish sperm motility. *Theriogenology* 2009; 71:1054–62. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.11.006>.

[24] Miliorini AB, Murgas LDS, Rosa PV, Oberlender G, Pereira GJM, Da Costa DV. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm

damages after cryopreservation. *Aquac Res* 2011; 42:177–87. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02575.x>.

[25] da Costa BB, Marques LS, Lassen PG, Rodrigues RB, Streit DP. Cryopreservation-induced morphological changes in the sperm of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). *J Appl Ichthyol* 2019; 35:987–93. <https://doi.org/10.1111/jai.13928>.

[26] Blom E. A One-Minute Live-Dead Sperm Stain by Means of Eosin-Nigrosin. *Fertil Steril* 1950; 1:176–7. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)30125-x](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)30125-x).

[27] Dai T, Zhao E, Lu G, Che K, He Q, Lu Y, et al. Sperm cryopreservation of yellow drum *Nibea albiflora*: A special emphasis on post-thaw sperm quality. *Aquaculture* 2012;368–369:82–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.09.017>.

[28] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248–54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

[29] Buege JA, Aust SD. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52:302–10. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6).

[30] LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. *Chem Res Toxicol* 1992; 5:227–31. <https://doi.org/10.1021/tx00026a012>.

[31] Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247:3170–5.

[32] Aebi H. [13] Catalase in Vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105:121–6. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).

[33] Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82:70–7. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).

[34] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175:184–91. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0).

- [35] Tripathi DN, Jena GB. Astaxanthin inhibits cytotoxic and genotoxic effects of cyclophosphamide in mice germ cells. *Toxicology* 2008; 248:96–103. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.03.015>.
- [36] Końca K, Lankoff A, Banasik A, Lisowska H, Kuszewski T, Gózdź S, et al. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 2003; 534:15–20. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00251-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00251-6).
- [37] Trivedi PP, Kushwaha S, Tripathi DN, Jena GB. Evaluation of male germ cell toxicity in rats: Correlation between sperm head morphology and sperm comet assay. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 2010; 703:115–21. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.08.005>.
- [38] Bobe J, Labbé C. Egg and sperm quality in fish. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 165:535–48. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.011>.
- [39] Kime DE, Van Look KJW, McAllister BG, Huyskens G, Rurangwa E, Ollevier F. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol* 2001; 130:425–33. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00270-8](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00270-8).
- [40] Cabrita E, Sarasquete C, Martínez-Páramo S, Robles V, Beirão J, Pérez-Cerezales S, et al. Cryopreservation of fish sperm: Applications and perspectives. *J Appl Ichthyol* 2010; 26:623–35. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01556.x>.
- [41] Carpenter JF, Crowe JH. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology* 1988; 25:244–55. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(88\)90032-6](https://doi.org/10.1016/0011-2240(88)90032-6).
- [42] Nakagata N. Production of normal young following transfer of mouse embryos obtained by in vitro fertilization between cryopreserved gametes. *J Reprod Fertil* 1993; 99:77–80. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0990077>.
- [43] Zhang L, Wang S, Chen W, Hu B, Ullah S, Zhang Q, et al. Pakistan Veterinary Journal Fine Structure of Zebrafish (*Danio rerio*) Spermatozoa 2014:14–100.
- [44] Aitken RJ, Wingate JK, De Iuliis GN, Koppers AJ, McLaughlin EA. Cis-unsaturated fatty acids stimulate reactive oxygen species generation and lipid

peroxidation in human spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:4154–63. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-1309>.

[45] Storey BT. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1997; 3:203–13. <https://doi.org/10.1093/molehr/3.3.203>.

[46] Fraser L, Strzezek J. Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing-thawing? *Theriogenology* 2007; 68:248–57. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.05.001>.

[47] Lahnsteiner F, Mansour N. A comparative study on antioxidant systems in semen of species of the Percidae, Salmonidae, Cyprinidae, and Lotidae for improving semen storage techniques. *Aquaculture* 2010; 307:130–40. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.07.011>.

[48] Chakraborty I, Kunti S, Bandyopadhyay M, Dasgupta A, Chattopadhyay GD, Chakraborty S. Evaluation of serum zinc level and plasma SOD activity in senile cataract patients under oxidative stress. *Indian J Clin Biochem* 2007; 22:109–13. <https://doi.org/10.1007/BF02913326>.

[49] Fernández-Gonzalez R, Moreira PN, Pérez-Crespo M, Sánchez-Martín M, Ramirez MA, Pericuesta E, et al. Long-Term Effects of Mouse Intracytoplasmic Sperm Injection with DNA-Fragmented Sperm on Health and Behavior of Adult Offspring1. *Biol Reprod* 2008; 78:761–72. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.065623>.

[50] Cabrita E, Martínez-Páramo S, Gavaia PJ, Riesco MF, Valcarce DG, Sarasquete C, et al. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture* 2014; 432:389–401. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.034>.

[51] Reinardy HC, Skippins E, Henry TB, Jha AN. Assessment of DNA damage in sperm after repeated non-invasive sampling in zebrafish *Danio rerio*. *J Fish Biol* 2013; 82:1074–81. <https://doi.org/10.1111/jfb.12042>.

[52] Cabrita E, Robles V, Rebordinos L, Sarasquete C, Herráez MP. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology* 2005; 50:144–53. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.12.003>.

- [53] Kumaravel TS, Vilhar B, Faux SP, Jha AN. Comet Assay measurements: A perspective. *Cell Biol Toxicol* 2009; 25:53–64. <https://doi.org/10.1007/s10565-007-9043-9>.
- [54] Gleib M, Schneider T, Schlörmann W. Comet assay: an essential tool in toxicological research. *Arch Toxicol* 2016; 90:2315–36. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1767-y>.
- [55] Bergeron A, Manjunath P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev* 2006; 73:1338–44. <https://doi.org/10.1002/mrd.20565>.

CAPÍTULO IV*

Estresse oxidativo e danos no DNA de espermatozoides de zebrafish em diferentes etapas do processo de criopreservação

*Artigo elaborado seguindo modelo de estrutura e formatação do periódico *Cryobiology*.

Estresse oxidativo e danos no DNA de espermatozoides de zebrafish em diferentes etapas do processo de criopreservação

Rômulo Batista Rodrigues^{1*}, Mariana Uczay², Verônica Bidinotto Brito^{3,4}, Mariana Feltrin Canever⁵, Antonio Cesar Godoy⁵, Dinara Jaqueline Moura⁴, Carla Ivane Ganz Vogel⁶, Danilo Pedro Streit Jr.¹

¹Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Terapêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Departamento de Fisioterapia, Faculdades Integradas de Taquara, Taquara, RS, Brasil.

⁴Laboratório de Genética Toxicológica, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁵Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.

⁶Laboratório de Bioquímica, Programa multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC, Brasil.

*Autor correspondente: Rômulo Batista Rodrigues, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Endereço: Avenida Bento Gonçalves 7712, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: rrodrigues1903@gmail.com.

Resumo: O objetivo do presente estudo foi avaliar o estresse oxidativo e os danos ao DNA em diferentes etapas do processo de criopreservação. Foram utilizadas quatro soluções crioprotetoras: SC1 (HBSS + Me₂SO 8%), SC2 (HBSS + Metanol 8%), SC3 (HBSS + Me₂SO 8% + Leite em pó desnatado 15%) e SC4 (HBSS + Metanol 8% + Leite em pó desnatado 15%). Para o processo de criopreservação, as amostras foram expostas às soluções crioprotetoras durante um tempo de equilíbrio de 10 minutos, e posteriormente criopreservadas. Após o tempo de equilíbrio a criopreservação aumentou a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) no grupo SC2, e nos grupos SC1, SC2 e SC3 o aumento ocorreu após o congelamento/descongelamento. Os grupos sulfidrílicos totais diminuíram após a exposição aos crioprotetores. Houve uma diminuição na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) após o tempo de equilíbrio e após congelamento/descongelamento. Por outro lado, houve um aumento da atividade da enzima catalase (CAT) após o tempo de equilíbrio e o congelamento/descongelamento. O ensaio cometa alcalino demonstrou que os danos ao DNA aumentaram após o tempo de equilíbrio, com um aumento ainda mais acentuado após o congelamento/descongelamento. O ensaio cometa modificado com a enzima Formamido Pirimidina Glicosilase (FPG) e Endonuclease III (ENDO III) demonstrou maiores danos ao DNA em relação ao ensaio cometa padrão, demonstrando grau elevado de oxidação de purinas e pirimidinas em todas etapas da criopreservação. Foi possível observar que a etapa de congelamento/descongelamento é responsável por causar maiores danos oxidativos e de DNA nos espermatozoides de zebrafish que a toxicidade dos crioprotetores durante a exposição na etapa de equilíbrio.

Palavras chave: crioprotetores, *Danio rerio*, danos ao DNA, danos oxidativos, ensaio cometa, tempo de equilíbrio.

1. Introdução

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas pelos espermatozoides em seu funcionamento normal durante a espermatogênese, especialmente pelas altas taxas de consumo de oxigênio mitocondrial no processo de replicação celular [1,2]. Quando as EROs se apresentam em concentrações fisiológicas, realizam papel importante na capacitação espermática [3], auxiliando na hiperativação e fusão do espermatozoide no oócito [4]. Os espermatozoides e o plasma seminal possuem moléculas com ação antioxidantes que auxiliam a eliminar

o excesso de EROs para evitar danos celulares [5]. No entanto, quando há um desbalanço entre a produção de EROs e a capacidade de defesa antioxidante, a célula entra em uma condição conhecida como estresse oxidativo ou desequilíbrio redox [1,6], podendo levar a danos ao DNA/RNA, proteínas e lipídeos [5]. Um elevado nível de geração de EROs também pode estar fortemente associado a espermatozoides danificados [7] e a infertilidade [8].

O estresse oxidativo produz diversos tipos de danos no DNA dos espermatozoides, como sua fragmentação, dano do DNA mitocondrial, anormalidades epigenéticas, atrito de telômeros e microdeleções do cromossomo Y [4]. Além disso, o estresse oxidativo pode não necessariamente causar quebra da cadeia de DNA, mas pode causar oxidação das bases nitrogenadas. A oxidação de bases é um dano direto do estresse oxidativo ao DNA e pode ser analisado por meio do ensaio cometa enzimático utilizando endonuclease específicas como a Formamido Pirimidina Glicosilase (FPG) e Endonuclease III (ENDO III), que reconhecem purinas e pirimidinas oxidadas, respectivamente [9–12].

Diversos estudos demonstraram que a criopreservação pode induzir as células espermáticas a um estado de estresse oxidativo e/ou aumentar os danos no DNA, em diferentes espécies de peixes, como *Sparus aurata* e *Dicentrarchus labrax* [13], *Pelteobagrus fulvidraco* [14], *Oncorhynchus mykiss* [15], *Danio rerio* [16], entre outros. Esse aumento no estresse oxidativo com possíveis danos no DNA pode ser um resultado da toxicidade dos agentes crioprotetores [17], ou da diluição do sêmen no extensor o qual reduz a concentração de compostos antioxidantes no plasma seminal, enfraquecendo a proteção e facilitando a ação das EROs e conseqüente geração de dano no DNA durante a criopreservação [13,15].

A forma como a criopreservação causa danos genéticos parece ser uma combinação complexa de processos, sendo que a geração de EROs durante a criopreservação pode modificar o DNA por oxidação de bases ou quebra da dupla fita do DNA [18]. Contudo, além do estresse oxidativo durante a criopreservação, o DNA pode ser danificado por meio de pressões mecânicas tais como a formação de cristais de gelo ou por eventos apoptóticos causados pelo estresse osmótico durante o congelamento/descongelamento [19]. Algumas evidências mostram que o processo de congelamento/descongelamento causa danos maiores do que a toxicidade dos crioprotetores [20].

O estresse oxidativo é uma das principais causas dos danos aos espermatozoides durante a criopreservação, sendo o DNA um alvo sensível às injúrias causadas pela criopreservação, contudo, ainda não se sabe ao certo como ocorrem esses danos e principalmente em qual momento do processo de criopreservação eles ocorrem. Assim, utilizou-se o zebrafish (*Danio rerio*) como modelo biológico deste estudo, com o objetivo de avaliar o aumento na produção de EROs e os possíveis danos oxidativos ao DNA em diferentes etapas do processo de criopreservação de sêmen.

2. Material e métodos

2.1. Criação dos zebrafish

Os zebrafish foram mantidos em uma densidade de dois animais/L de água, em um fotoperíodo de 14:10 (luz:escuro), em temperatura de 28 ± 1 °C e pH $7,1 \pm 1,2$, em aquários de vidro (30 litros) contendo aeração, termostato para controle e manutenção da temperatura da água e filtragem mecânica, química e biológica. Foi realizada a limpeza e remoção de sujidades diariamente, com renovação da água de 10% do volume total do aquário. Os peixes foram alimentados três vezes ao dia com ração comercial floculada (Alcon Basic®) e artêmia, até a saciedade aparente.

Foram utilizados 100 machos de zebrafish, aptos a reprodução entre 6 a 12 meses de idade. Os peixes selecionados para o experimento apresentaram peso médio de $508,02 \pm 122,02$ mg, comprimento total médio de $35,53 \pm 3,39$ mm, peso médio das gônadas ($5,89 \pm 4,74$ mg), índice gonadosomático (IGS) de $1,13 \pm 0,82$, que foi calculado através da fórmula $IGS = ((\text{peso da gônada}/\text{peso corporal}) \times 100)$, fator de condição (K) de $1,14 \pm 0,22$, que foi calculado através da fórmula $K = ((\text{peso corporal}/\text{comprimento total}^3) \times 100)$ e concentração espermática de $1,30 \times 10^8 \pm 1,15 \times 10^8$ células/mL, que foi mensurado na câmara de Neubauer em microscópio óptico (Eclipse E200, Nikon), em aumento de 400x.

O experimento foi realizado de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal – CONCEA e aprovado no Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sobre o projeto N° 35329.

2.2. Coleta e processamento do sêmen

Para a coleta das amostras de sêmen, os peixes foram eutanasiados em dose letal de triclaína metano sulfato ($0,6$ mg/mL; $27 \pm 0,5$ °C; pH $7,1 \pm 0,1$) [21]. Em seguida

os peixes foram enxaguados para retirada do anestésico, secados suavemente em toalha de papel para retirada do excesso de água e posteriormente foi mensurado o peso úmido dos animais e comprimento total. O sêmen foi coletado pela remoção cirúrgica dos testículos. O tecido aderente foi dissecado e os testículos colocados em microtubo de 1,5mL e pesados. Foi adicionado ao microtubo o extensor utilizado para diluição do sêmen em uma proporção de gônada e extensor de 1:25 (peso da gônada: volume do extensor).

O extensor utilizado foi a solução salina balanceada de Hank (HBSS) (8,0g de NaCl, 0,4g KCl, 0,16g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,06g de Na_2HPO_4 , 0,06g de KH_2PO_4 , 0,35g de NaHCO_3 , 1g de $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, em 1000mL de água destilada, pH 7,5, e osmolaridade de 300mOsm/L). O sêmen foi suspenso na solução por meio de lavagem com auxílio de pipeta, resumidamente, o tecido aderido foi pressionado suavemente com a ponteira contra o interior do microtubo, para que o tecido se abrisse e libera-se os espermatozoides, posteriormente o conteúdo foi pipetado consecutivamente (cerca de 10 vezes) de maneira suave para que o conteúdo seminal saia de dentro do tecido aderido, posteriormente o tecido da gônada foi retirado do microtubo. O método de coleta de sêmen por meio de lavagem dos testículos foi utilizado nesse estudo, a partir das recomendações e êxito relatados em diversos estudos em zebrafish [22,23,24,25,16]. Logo após a coleta do sêmen uma amostra de 5 μl de sêmen diluído foi retirada para avaliar se houve ativação prematura da motilidade espermática.

Foram compostos dez “pools” de sêmen de dez machos cada, diluídos em HBSS e distribuídos entre os grupos experimentais. Foram testadas quatro soluções crioprotetoras (SC): SC1: HBSS + 8% Me_2SO ; SC2: HBSS + 8% Metanol; SC3: HBSS + 8% Me_2SO + 15% Leite em pó desnatado; SC4: HBSS + 8% Metanol + 15% Leite em pó desnatado. As soluções foram preparadas para conterem o dobro do % de crioprotetores, pois no momento do congelamento metade da amostra é composta pelo sêmen diluído com o extensor do tratamento e a outra metade com a solução crioprotetora. Desta maneira ao misturar a solução crioprotetora com o sêmen previamente diluído foram obtidas as concentrações finais dos crioprotetores desejadas para cada tratamento, como está demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Composição das soluções crioprotetoras utilizadas na criopreservação de sêmen de zebrafish.

Soluções crioprotetoras	HBSS	DMSO¹ (8%)	Metanol² (8%)	Leite em pó³ (15%)
SC 1	X	X		
SC 2	X		X	
SC 3	X	X		X
SC 4	X		X	X

^{1,2}Sigma-Aldrich®, ³Leite em pó desnatado Molico (Nestlé®)

2.3. Congelamento e descongelamento do sêmen

O sêmen já diluído no extensor foi distribuído em criotubos (2mL) no volume de 10µl por criotubo, onde posteriormente foi adicionado e misturado com auxílio de uma pipeta 10µl da solução crioprotetora (para cada diferente tratamento). A diluição final com a solução crioprotetora foi de 1:50 – gônada: volume de solução [16]. O tempo de equilíbrio da amostra com o crioprotetor antes do congelamento foi de 10 minutos, pois tempos maiores causam redução significativa da motilidade espermática pós-descongelamento [26].

Para o congelamento seguimos as recomendações de Matthews et al. [26], para obter uma taxa de resfriamento de 14-16 °C/min, considerada ideal para a espécie quando se utiliza gelo seco e isopor como meio de criopreservação, como descrito em seguida. Após o tempo de equilíbrio, o criotubo contendo a amostra foi colocado em um tubo falcon (15mL) acima de outro criotubo vazio e sem tampa, e logo em seguida o tubo falcon com a amostra foi colocado em gelo seco triturado durante 20 minutos. Ao término dos 20 minutos de congelamento, os criotubos foram transferidos para o nitrogênio líquido para armazenamento. Para o descongelamento, as amostras foram aquecidas em banho-maria a 38 °C durante 10 segundos [26] e posteriormente analisadas.

2.6. Avaliação de genotoxicidade e estresse oxidativo

A avaliação do estresse oxidativo ocorreu através da análise da oxidação da diclorofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA) que quantifica a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), bem como através da análise do perfil antioxidante enzimático (atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD)) e não enzimático (quantificação de grupos sulfidrílicos totais). Foram realizadas avaliações de genotoxicidade através das análises de Ensaio Cometa padrão, Ensaio Cometa modificado com a enzima FPG e Ensaio Cometa modificado com a enzima

ENDO III. As análises foram realizadas em três diferentes etapas do processo de criopreservação, no sêmen fresco já diluído no extensor; após os 10 minutos de exposição das amostras aos crioprotetores durante o tempo de equilíbrio, e após o congelamento/descongelamento das amostras. Dessa maneira procuramos identificar o momento de geração dos danos oxidativos e genotóxicos nos espermatozoides de zebrafish durante o processo de criopreservação.

2.6.1. Quantificação proteica

A concentração de proteína nos extratos proteicos foi determinada de acordo com o método já descrito por Bradford [27] utilizando albumina sérica bovina como padrão e leitura espectrofotométrica a 595nm. Este método baseia-se na ligação do corante (Coomassie Brilliant Blue /G-250) com moléculas de proteínas da amostra, formando um complexo de cor azul. Os dados obtidos através da quantificação proteica foram utilizados nos cálculos das outras variáveis bioquímicas analisadas. Nas amostras em que foi utilizado leite em pó, descontou-se o valor proteico exclusivo do leite em pó desnatado, através da leitura em espectrofotômetro de uma amostra contendo somente o leite em pó desnatado diluído no extensor.

2.6.2. Avaliação da Oxidação da Diclorofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA)

A geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) foi estimada pelo método descrito por LeBel et al. [28] utilizando H₂DCF-DA, o qual, na presença de EROs, conduz à produção de diclorofluoresceína (DCF), um produto fluorescente que pode ser quantificado por fluorimetria. A intensidade de fluorescência foi avaliada em SpectraMax® M2e Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California) utilizando excitação e emissão a 480 e 535nm, respectivamente. Uma curva de calibração foi realizada com DCF padrão (10µM) e os níveis de EROs expressos como µmol DCF/mg de proteína. As análises foram realizadas em triplicatas de amostras independentes.

2.6.3. Quantificação de grupos sulfidrílicos totais

A quantificação de grupos sulfidrílicos totais baseia-se na redução do ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico, que gera um produto amarelo (titionitrobenzoico), cuja absorvância pode ser verificada em 412nm, segundo protocolo estabelecido por Ellman [29]. O conteúdo de grupos sulfidrílicos totais (-SH) correlaciona-se

inversamente com o dano oxidativo em proteínas. A quantificação baseou-se em curva padrão utilizando cisteína 0,5mM como padrão, e os resultados foram expressos como nmol/mg de proteína. As análises foram realizadas em triplicatas de amostras independentes.

2.6.4. Avaliação da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi mensurada pelo método descrito por Misra e Fridovich [30], o qual estima a dismutação do radical superóxido através da inibição da oxidação da adrenalina, em 480nm. A inibição da oxidação da adrenalina ocorre pela presença de enzima SOD na amostra, e a atividade foi indiretamente avaliada em modo cinético no leitor de microplaca SpectraMax[®] M2e (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California). Uma unidade (U) de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da oxidação da adrenalina, tendo a atividade expressa como U SOD/mg de proteína. As análises foram realizadas em triplicatas de amostras independentes.

2.6.5. Avaliação da atividade da enzima Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada pelo método descrito por Aebi [31] o qual se baseia no decréscimo da absorvância em 240nm, em presença de H₂O₂ no meio de reação. A atividade foi avaliada em modo cinético no leitor de microplaca SpectraMax[®] M2e (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California). Uma unidade (U) de CAT é definida como 1µmol de H₂O₂ consumido por minuto, tendo a atividade expressa como U CAT/mg de proteína. As análises foram realizadas em triplicatas de amostras independentes.

2.6.6. Ensaio cometa alcalino e ensaio cometa enzimático (FPG e ENDO III)

Para a técnica de ensaio cometa alcalino foi utilizado o método previamente descrito por Singh et al. [32] com algumas adaptações, já para o ensaio cometa modificado com Formamido Pirimidina Glicosilase (FPG) foi utilizado o protocolo de Dunsiska e Collins [33] com modificações. O ensaio modificado com Endonuclease III (ENDO III) foi baseado no protocolo de Collins et al. [34] com adaptações.

Primeiramente, lâminas histológicas foram lavadas com detergente, secas em estufa e limpas com etanol, em seguida recobertas com uma camada de agarose (1,5%) com ponto de fusão normal (NMP). As amostras (50µL) foram misturadas com

110 μ L de agarose com baixo ponto de fusão (LMP) e depositadas sobre as lâminas pré-recobertas com agarose NMP. Posteriormente as lâminas foram deixadas em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, TRIS 10 mM) *over-night*. Para o controle positivo foi utilizado 10 μ L de peróxido de hidrogênio (100 μ M) em 190 μ L da amostra, incubada a 4°C por 10 minutos.

As lâminas com tratamento enzimático passaram por tratamento em tampão de reação, sendo realizadas três lavagens de cinco minutos cada, com tampão de HEPES (40 mM), KCl (0,1M), EDTA (0,5 mM) e BSA (0,2 mg/mL), pH 8,0. Em seguida permaneceram por um período de trinta minutos de incubação com a enzima específica em câmara úmida à 37°C. Posteriormente, as lâminas passaram por uma etapa de 20 minutos de desenrolamento alcalino, com solução de NaOH (0,3 M) e EDTA (1 mM), pH 10. Após, essas lâminas foram submetidas à eletroforese por 20 minutos, em 1V/cm e 300mA. Em seguida foi realizado uma etapa de neutralização das lâminas com TRIS (0,4 M), pH 7,5, e uma etapa de fixação das lâminas com etanol 100%. Ao final, as lâminas foram coradas com solução de brometo de etídeo, e analisadas em microscópio de epi-fluorescência (Axio Imager A2, Carl Zeiss) com filtro de 605nm, com o software Comet Imager 2.2 da Metasystem®.

Dentre todas as variáveis que o software analisa, escolhemos o % de DNA na cauda do cometa, o comprimento da cauda do cometa (μ m), o Tail Moment e o Olive Tail Moment, por serem os principais parâmetros de análise de danos no DNA do cometa utilizados na literatura. O Olive Tail Moment é o principal índice de dano ao DNA [35], e é o produto do % de DNA na cauda e da distância mediana da migração que se dá pela distância entre o centro de gravidade da cabeça do cometa e o centro de gravidade da cauda do cometa. O comprimento da cauda do cometa é a distância máxima que o DNA danificado migra do centro do núcleo da célula até a ponta da cauda. O % de DNA na cauda é o DNA total que migra do núcleo para a cauda do cometa. O Tail Moment é o produto do comprimento da cauda e a porcentagem de DNA da cauda, o que fornece uma medida mais integrada do dano geral ao DNA na célula [36,37]. Foram analisados 100 cometas por lâmina e nove lâminas por tratamento.

2.7. Análise estatística dos dados

Os dados estão apresentados como médias e desvio padrão. A normalização dos dados em logaritmo ou arco-seno foi realizada quando necessário.

Posteriormente aplicou-se uma análise de variância de duas vias (Two-way ANOVA), levando em consideração como fatores os efeitos das soluções crioprotetoras, o efeito do tempo, ou seja, da etapa do processo de criopreservação (análise do sêmen fresco diluído, análise após a exposição das amostras aos crioprotetores no tempo de equilíbrio e análise após o congelamento/descongelamento das amostras) e o efeito da interação entre os fatores. Quando observado diferença significativa dentro dos fatores foi aplicado testes post hoc de Tukey ou de Bonferroni. Todos os testes foram realizados considerando uma significância de 5%. As análises estatísticas e confecção dos gráficos foi realizada com auxílio do software Graphpad Prism 7.0.

Com a intenção de avaliar de forma mais abrangente o conjunto de dados obtidos nos tratamentos SC1, SC2, SC3 e SC4, e nos diferentes momentos do processo de criopreservação (fresco, após o tempo de equilíbrio e após o congelamento/descongelamento), e desta forma, ver o comportamento das respostas através dos parâmetros avaliados no sêmen, os dados foram tabulados e normalizados para atribuir pesos iguais a todas as variáveis, seguindo para a realização da análise de componentes principais (PCA), através da função “PRINCOMP” do software R. O PCA condensa informações contidas nas diversas variáveis originais em um conjunto menor de novas dimensões com mínima perda de informações através de combinações lineares destas variáveis

3. Resultados

3.1. Avaliação do estresse oxidativo em diferentes etapas da criopreservação

Os resultados das análises bioquímicas de estresse oxidativo quanto ao efeito das soluções crioprotetoras, da etapa da criopreservação e da interação entre esses fatores para todas as variáveis analisadas podem ser observadas na Figura 1.

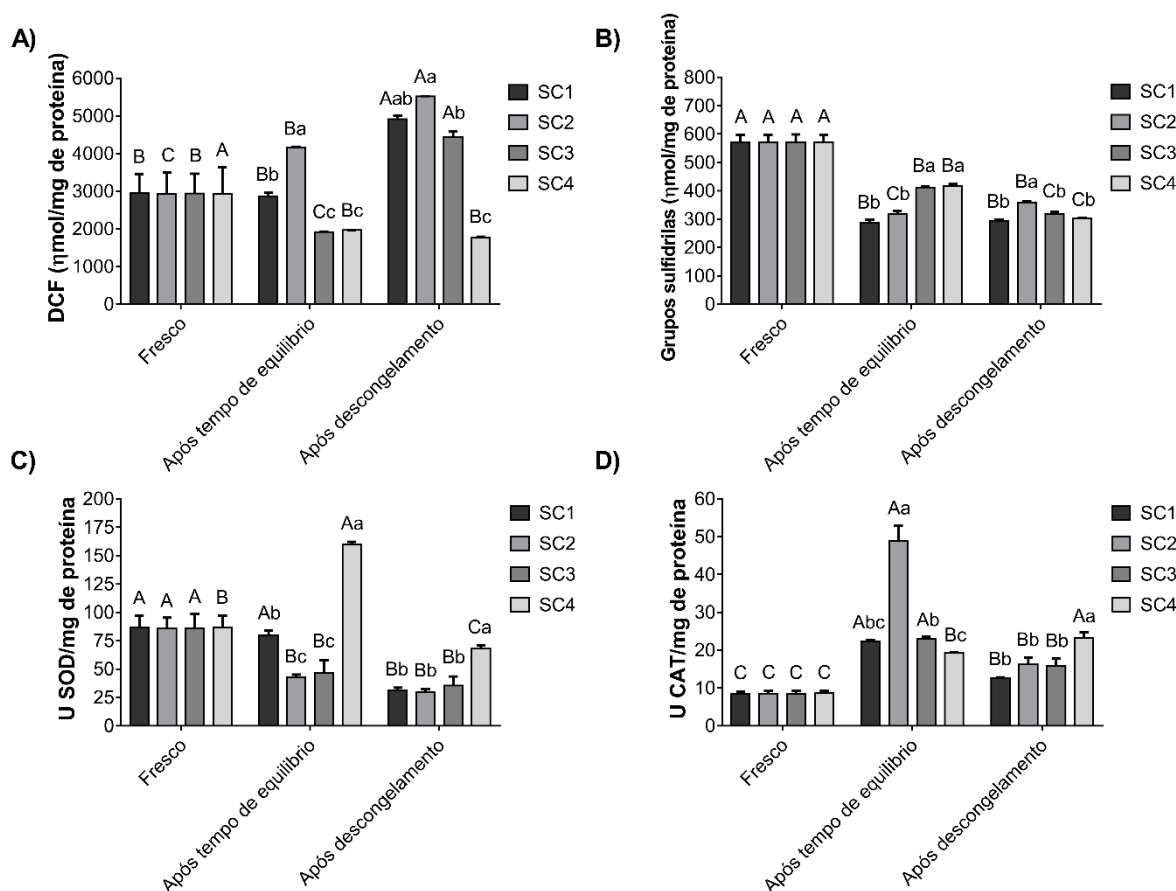


Figura 1. Análises bioquímicas de estresse oxidativo. A) Avaliação da Oxidação da Diclorofluoresceína diacetato (DCF) (Efeito das soluções crioprotetoras: $P < 0,0001$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P < 0,0001$); B) Quantificação de grupos sulfidrilos totais (SH) (Efeito das soluções crioprotetoras: $P < 0,0001$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P < 0,0001$); C) Atividade enzimática da Superóxido dismutase (SOD) (Efeito das soluções crioprotetoras: $P < 0,0001$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P < 0,0001$); D) Atividade enzimática da Catalase (CAT) (Efeito das soluções crioprotetoras: $P < 0,0001$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P < 0,0001$). Letras maiúsculas distintas indicam diferença entre a etapa da criopreservação, dentro de cada solução crioprotetora pelo teste de Tukey. Letras minúsculas distintas indicam diferença entre as soluções crioprotetoras, dentro de cada etapa da criopreservação, pelo teste de Tukey.

A análise de oxidação da DCF demonstrou que houve redução na geração de EROs nos grupos experimentais SC3 e SC4 após o tempo de equilíbrio com relação ao observado no sêmen fresco. Após o congelamento/descongelamento das amostras houve um aumento na produção de EROs nos grupos criopreservados com as soluções SC1, SC2 e SC3 em relação aos valores obtidos para os mesmos grupos após o tempo de equilíbrio, enquanto no grupo SC4 os valores de EROs

permaneceram semelhantes nas duas etapas. Entre os grupos experimentais, após o tempo de equilíbrio, à maior geração de EROs ocorreu no grupo SC2, seguido pelo grupo SC1, enquanto os menores valores foram observados nos grupos SC3 e SC4. Após o congelamento/descongelamento das amostras, houve maior geração de EROs no grupo SC2, seguido pelo grupo SC1 e pelo grupo SC3, sendo o grupo SC4 o que apresentou menor geração de EROs após essa etapa (Figura 1A).

A avaliação do perfil antioxidante não enzimático demonstrou que houve redução nos grupos sulfidrilas (SH) totais após todas as etapas de equilíbrio e congelamento/descongelamento, com relação ao nível observado no sêmen fresco, em todos os grupos experimentais. Observou-se um aumento dos valores de SH no grupo SC2 após o congelamento/descongelamento em relação à análise após o equilíbrio, enquanto os grupos SC3 e SC4 apresentaram menores valores de grupos SH após o congelamento/descongelamento, com relação aos mesmos grupos na etapa de equilíbrio. O nível de grupos SH permaneceu igual entre as duas etapas no grupo experimental SC1. Entre todos os grupos experimentais, após a etapa de equilíbrio houve maiores valores de grupos SH nos tratamentos SC3 e SC4 e após o processo de congelamento/descongelamento o maior valor de grupos SH foi observado no grupo SC2 (Figura 1B).

A análise do perfil antioxidante enzimático mostrou que a atividade da enzima SOD nos grupos criopreservados com as soluções SC2 e SC3 diminuiu após o tempo de equilíbrio das amostras, com relação à atividade da enzima observada na amostra fresca, e permaneceu igual após o congelamento/descongelamento das amostras em relação ao tempo de equilíbrio. Para as amostras criopreservadas com a solução SC1, a atividade da enzima SOD caiu apenas após o processo de congelamento/descongelamento. Por outro lado, nas amostras criopreservadas com a solução SC4, observou-se um pico de atividade de SOD após o tempo de equilíbrio, sendo o maior nível de atividade entre todos os tratamentos, observando-se uma queda da atividade após o congelamento/descongelamento, com relação ao sêmen fresco. Entre todas as soluções crioprotetoras, observou-se que tanto após o tempo de equilíbrio quanto após o congelamento/descongelamento das amostras, a solução SC4 apresentou os maiores valores de atividade de SOD (Figura 1C).

A avaliação da atividade da enzima catalase revelou maior atividade após o tempo de equilíbrio das amostras e do congelamento/descongelamento, em relação ao sêmen fresco em todos os grupos experimentais. Observou-se a maior atividade

da enzima CAT após o tempo de equilíbrio para os grupos criopreservados com as soluções SC1, SC2 e SC3, enquanto no grupo SC4 a maior atividade observada foi após o congelamento/descongelamento. Entre as soluções crioprotetoras, observou-se que após o tempo de equilíbrio a maior atividade da enzima CAT foi no grupo SC2 que diferiu dos outros grupos experimentais, e a menor atividade foi no grupo SC4, porém não diferindo do SC1. Para a avaliação após o processo de congelamento/descongelamento, houve maior atividade da enzima CAT para o grupo criopreservado com a solução SC4 em comparação às outras soluções (Figura 1D).

3.2. Avaliação da fragmentação de DNA por meio de Ensaio Cometa

Na Figura 2, pode ser observado imagens obtidas das análises de cometas pelo software Comet Imager 2.2. As imagens demonstram fragmentação de DNA crescentes, onde a Figura 2A mostra a imagem de um espermatozoide com baixa fragmentação de DNA, e a Figura 2D a imagem de um espermatozoide com alta fragmentação de DNA. Nas imagens apresentadas nas Figuras 2E e 2H estão demonstrados os cometas como observados no microscópio de epi-fluorescência, corados com brometo de etídeo, sendo demonstrados espermatozoides com menor fragmentação de DNA até os de alta fragmentação de DNA.

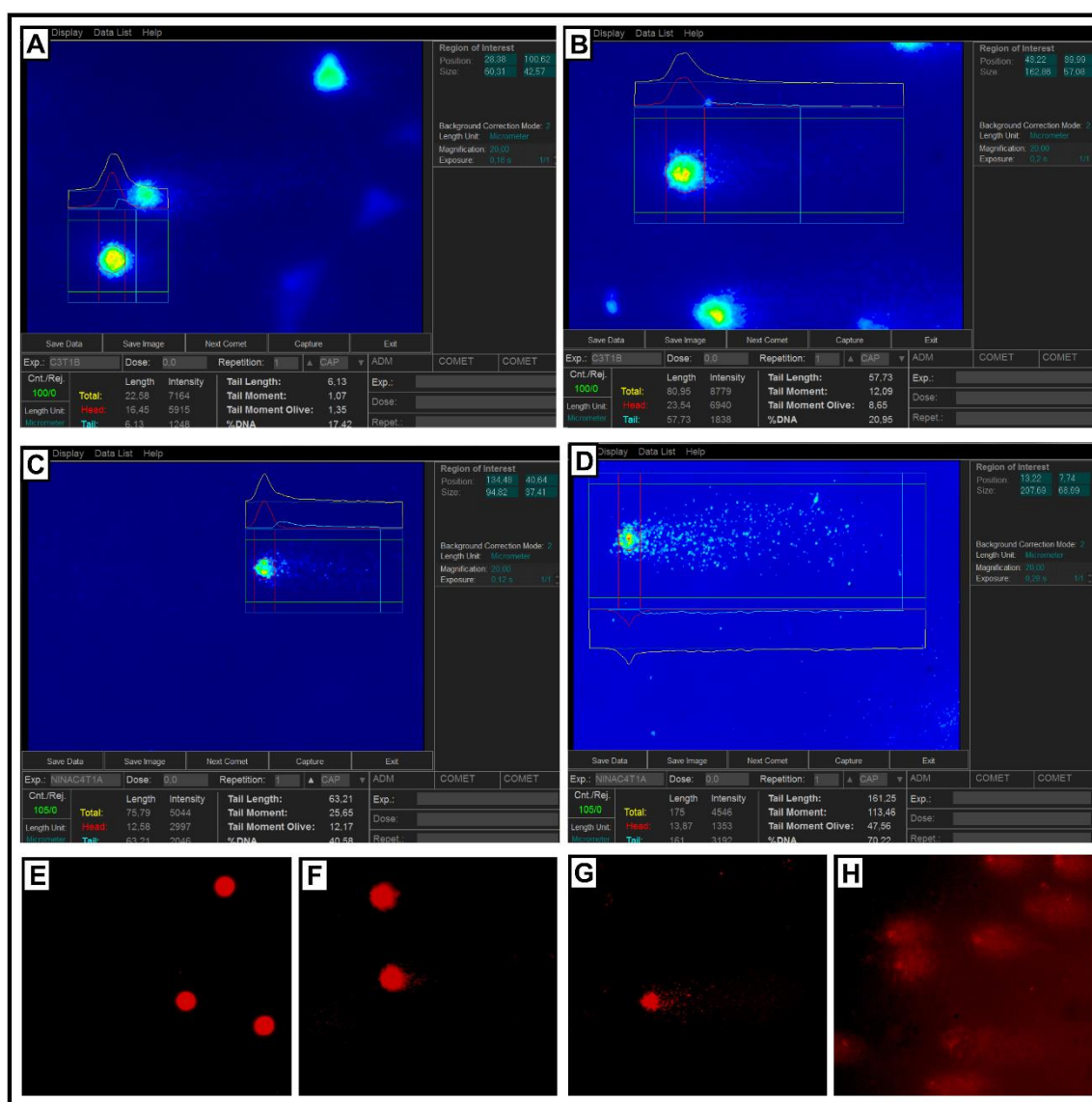


Figura 2. . A-D: Imagens obtidas através das análises dos cometas com software Comet Imager 2.2. E-H: Imagens obtidas da visualização de cometas em microscópio de epi-fluorescência, corados com brometo de etídeo.

3.2.1. Ensaio cometa alcalino

O resultado da análise do ensaio cometa alcalino padrão realizadas em diferentes etapas da criopreservação pode ser observado na Figura 3. Observou-se efeito das soluções crioprotetoras, da etapa da criopreservação e da interação entre esses fatores para todas as variáveis analisadas.

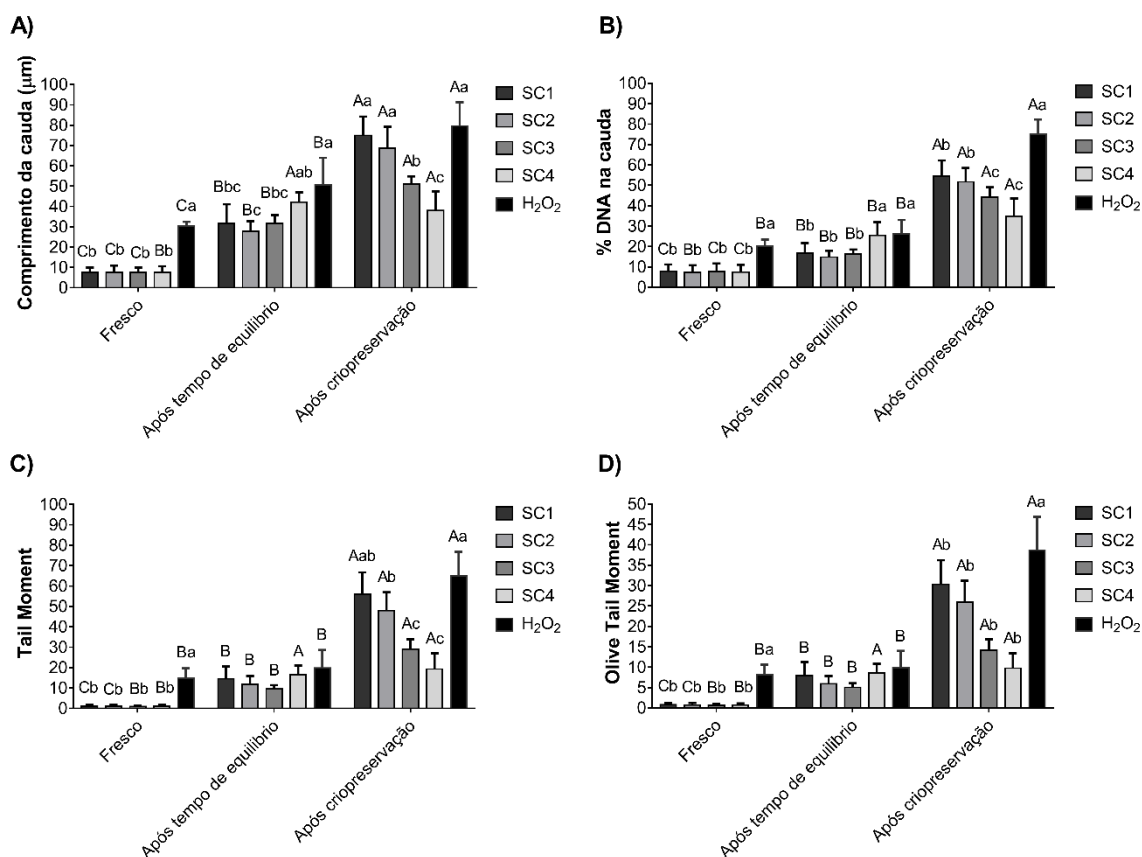


Figura 3. Ensaio cometa alcalino padrão. A) Comprimento da cauda do cometa (Efeito das soluções crioprotetoras: $P < 0,0001$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P < 0,0001$); B) % de DNA na cauda do cometa (Efeito das soluções crioprotetoras: $P < 0,0001$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P < 0,0001$); C) Tail Moment (Efeito das soluções crioprotetoras: $P < 0,0001$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P < 0,0001$); D) Olive Tail Moment (Efeito das soluções crioprotetoras: $P < 0,0001$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P < 0,0001$). Letras maiúsculas distintas indicam diferença entre a etapa da criopreservação, dentro de cada solução crioprotetora pelo teste de Tukey. Letras minúsculas distintas indicam diferença entre as soluções crioprotetoras, dentro de cada etapa da criopreservação, pelo teste de Tukey.

Foram analisados os principais parâmetros de análise de danos no DNA, como descrito a seguir. O comprimento da cauda do cometa aumentou após as etapas de equilíbrio e congelamento/descongelamento em todos os grupos experimentais. Para os grupos criopreservados com as soluções SC1, SC2 e SC3 houve aumento do comprimento da cauda do cometa após o congelamento/descongelamento em relação à etapa de equilíbrio, enquanto para o grupo SC4 o comprimento da cauda do cometa permaneceu igual entre as duas etapas. Como esperado, o dano ao DNA induzido por

H₂O₂ (controle positivo do teste) foi maior em todas as etapas. Para a análise após o tempo de equilíbrio, houve diferença entre o grupo SC4 que apresentou o maior comprimento de cauda entre os grupos experimentais, e o SC2 que apresentou o menor comprimento. Após a etapa de congelamento/descongelamento, os maiores valores de comprimento de cauda foram observados nos grupos SC1 e SC2, seguidos pelo SC3 e o menor valor foi no grupo SC4 (Figura 3A).

Observou-se um aumento significativo no % de DNA na cauda do cometa após as etapas de equilíbrio e congelamento/descongelamento, com exceção do grupo SC2 que aumentou o % de DNA na cauda apenas depois do congelamento/descongelamento. A etapa de congelamento/descongelamento resultou em maior % de DNA na cauda do cometa com relação a análise realizada após o tempo de equilíbrio em todos os grupos experimentais. Além disso, os grupos SC3 e SC4 apresentaram maiores % de DNA na cauda com relação aos grupos SC1 e SC2 após o tempo de equilíbrio; contudo, na avaliação após o congelamento/descongelamento, os valores de SC3 e SC4 foram menores que do SC1 e SC2 (Figura 3B).

As variáveis Tail Moment e Olive Tail Moment apresentaram comportamentos similares. Houve um aumento no dano ao DNA após o tempo de equilíbrio com relação ao sêmen fresco em todos os grupos experimentais, com exceção do grupo SC3 que apresentou danos iguais entre as etapas. Houve um aumento do dano ao DNA após a etapa de congelamento/descongelamento com relação aos danos observados após o tempo de equilíbrio em todos os grupos experimentais, com exceção do grupo SC4, que apresentou valores iguais de danos nas duas etapas. Entre todos os grupos experimentais, após a etapa de congelamento/descongelamento, os maiores valores de dano ao DNA foram observados nos grupos SC1 e SC2, e os menores foram observados nos grupos SC3 e SC4 (Figuras 3C e D).

3.2.2. Ensaio cometa enzimático (Formamido Pirimidina Glicosilase – FPG)

O resultado da análise do ensaio cometa enzimático com FPG realizadas em diferentes etapas da criopreservação pode ser observado na Figura 4.

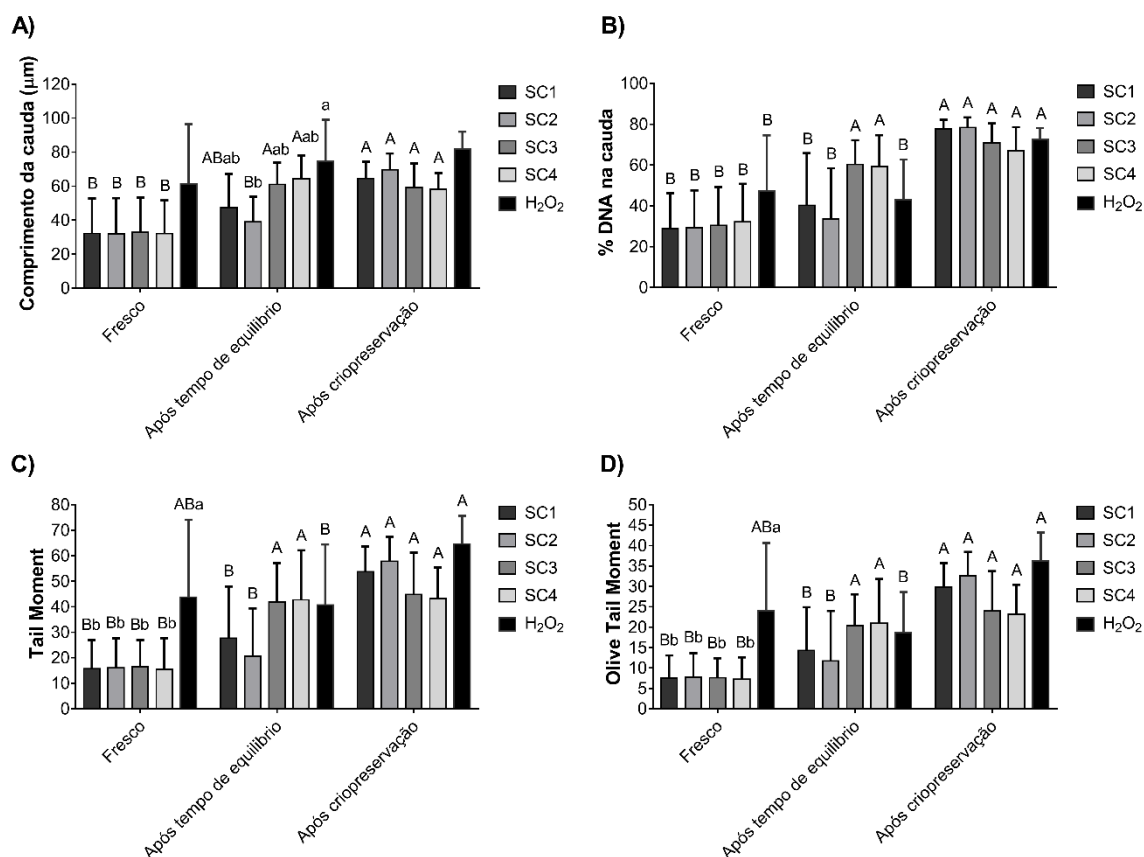


Figura 4. Ensaio cometa enzimático (Formamido Pirimidina Glicosilase - FPG). A) Comprimento da cauda do cometa (Efeito das soluções crioprotetoras: $P=0,0003$; Efeito da etapa da criopreservação: $P<0,0001$; Interação entre fatores: $P=0,3570$); B) % de DNA na cauda do cometa (Efeito das soluções crioprotetoras: $P=0,6350$; Efeito da etapa da criopreservação: $P<0,0001$; Interação entre fatores: $P=0,0603$); C) Tail Moment (Efeito das soluções crioprotetoras: $P=0,0078$; Efeito da etapa da criopreservação: $P<0,0001$; Interação entre fatores: $P=0,0888$); D) Olive Tail Moment (Efeito das soluções crioprotetoras: $P=0,0085$; Efeito da etapa da criopreservação: $P<0,0001$; Interação entre fatores: $P=0,0593$). Letras maiúsculas distintas indicam diferença entre a etapa da criopreservação, dentro de cada solução crioprotetora pelo teste de Tukey. Letras minúsculas distintas indicam diferença entre as soluções crioprotetoras, dentro de cada etapa da criopreservação, pelo teste de Tukey.

Observou-se efeito das soluções crioprotetoras e da etapa da criopreservação para o comprimento da cauda do cometa, não houve efeito da interação entre esses fatores (Figura 4A). Houve um aumento do comprimento da cauda dos grupos SC3 e SC4 analisados após o tempo de equilíbrio com relação à análise do sêmen fresco, enquanto nos grupos SC1 e SC2 os danos observados após o tempo de equilíbrio e no fresco foram iguais. Houve um aumento no comprimento da cauda do cometa após o congelamento/descongelamento em relação a etapa de equilíbrio no grupo criopreservado com a solução SC2, sendo que nas outras soluções crioprotetoras os

valores foram iguais nas duas etapas. Não foi observada diferença entre os grupos experimentais em nenhuma das etapas de avaliação, apenas observou-se diferença entre o controle positivo (H_2O_2) e o grupo SC2 após o equilíbrio.

Para o % de DNA na cauda do cometa, observou-se efeito das etapas de criopreservação, contudo, não houve efeito das soluções crioprotetoras e da interação entre fatores (Figura 4B). Houve um aumento no % de DNA na cauda do cometa nos grupos SC3 e SC4 após a etapa de equilíbrio com relação à análise do sêmen fresco, enquanto para os outros grupos o % de DNA na cauda permaneceu igual entre as etapas. Observou-se aumento do % de DNA na cauda do cometa após o congelamento/descongelamento em comparação com a etapa de equilíbrio nos grupos SC1 e SC2, para o SC3 e SC4 o % de DNA na cauda permaneceu igual entre as etapas.

Para as variáveis Tail Moment e Olive Tail Moment, observou-se efeito das soluções crioprotetoras e da etapa da criopreservação, contudo, não houve efeito da interação entre os fatores (Figuras 4C e D). Observou-se aumento do dano ao DNA após o equilíbrio com relação ao sêmen fresco nos grupos SC3 e SC4, permanecendo igual nos demais grupos. Após a etapa de congelamento/descongelamento houve maiores danos ao DNA nos grupos SC1 e SC2 com relação ao observado após a etapa de equilíbrio, permanecendo o dano semelhante nos grupos SC3 e SC4. Não houve diferença entre as soluções crioprotetoras em nenhuma das etapas.

3.2.3. Ensaio cometa enzimático (Endonuclease III – ENDO III)

O resultado da análise do ensaio cometa enzimático com ENDO III realizadas em diferentes etapas da criopreservação pode ser observado na Figura 5.

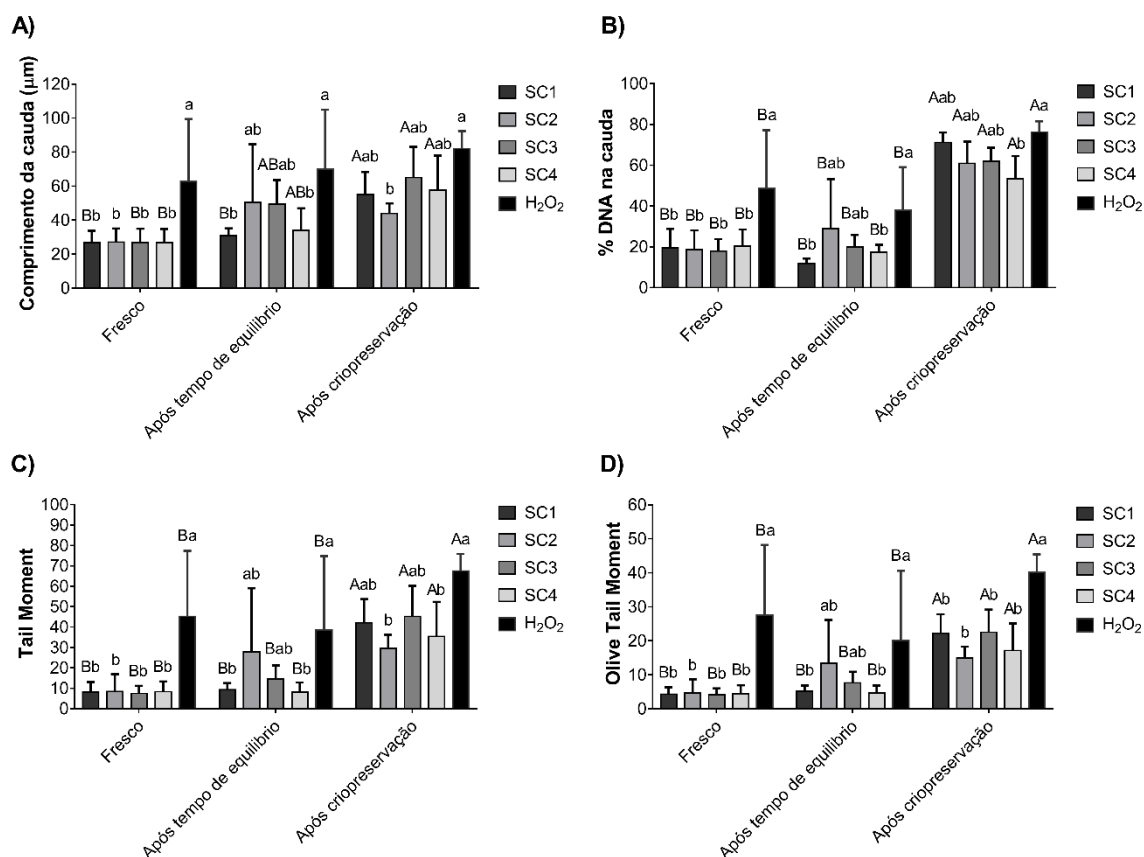


Figura 5. Ensaio cometa enzimático (Endonuclease III – ENDO III). A) Comprimento da cauda do cometa (Efeito das soluções crioprotetoras: $P < 0,0001$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P = 0,5372$); B) % de DNA na cauda do cometa (Efeito das soluções crioprotetoras: $P < 0,0001$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P = 0,1370$); C) Tail Moment (Efeito das soluções crioprotetoras: $P < 0,0001$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P = 0,3696$); D) Olive Tail Moment (Efeito das soluções crioprotetoras: $P < 0,0001$; Efeito da etapa da criopreservação: $P < 0,0001$; Interação entre fatores: $P = 0,3223$). Letras maiúsculas distintas indicam diferença entre a etapa da criopreservação, dentro de cada solução crioprotetora pelo teste de Tukey. Letras minúsculas distintas indicam diferença entre as soluções crioprotetoras, dentro de cada etapa da criopreservação, pelo teste de Tukey.

Observou-se efeito das soluções crioprotetoras e da etapa da criopreservação para o comprimento da cauda do cometa, não houve efeito da interação entre esses fatores (Figura 5A). Houve diferença entre as diferentes etapas da criopreservação nos grupos experimentais SC1, SC3 e SC4 para o comprimento da cauda do cometa. Não foi observado aumento do comprimento da cauda do cometa após a etapa de equilíbrio com relação à análise do sêmen fresco para nenhum dos grupos experimentais. Houve aumento no comprimento da cauda do cometa após o congelamento/descongelamento das amostras no grupo SC1, não diferindo nos

demais grupos experimentais. Entre os grupos experimentais, não houve diferença em nenhuma etapa da criopreservação.

Para o % de DNA na cauda do cometa, observou-se efeito das soluções crioprotetoras e das etapas de criopreservação, contudo, não houve efeito da interação entre fatores (Figura 5B). Não foi observado aumento no % de DNA na cauda do cometa em nenhum dos grupos experimentais após o tempo de equilíbrio com relação à análise do sêmen fresco. Tanto após a etapa de congelamento/descongelamento quanto após o tempo de equilíbrio houve um maior % de DNA na cauda com relação ao observado no sêmen fresco em todos os grupos experimentais. Não houve diferença significativa em nenhuma etapa da criopreservação entre os grupos experimentais criopreservados.

Para as variáveis Tail Moment e Olive Tail Moment, observou-se efeito das soluções crioprotetoras e das etapas da criopreservação, contudo, não houve efeito da interação entre os fatores (Figuras 5C e D). Houve diferença significativa para o dano no DNA avaliado pelas variáveis Tail Moment e Olive Tail Moment, entre as diferentes etapas da criopreservação nos grupos experimentais SC1, SC3 e SC4. Observou-se um aumento do dano ao DNA nos grupos SC1, SC3 e SC4 após o congelamento/descongelamento com relação às análises do sêmen fresco e etapa de tempo de equilíbrio. Entre os grupos experimentais criopreservados, não houve diferença em nenhuma etapa da criopreservação para as variáveis Tail Moment e Olive Tail Moment. As amostras com H₂O₂ apresentaram maiores danos ao DNA que os grupos SC1 e SC4 após o tempo de equilíbrio e maior que os grupos SC2 e SC4 após o congelamento/descongelamento.

3.3. Análise de Componentes Principais (PCA)

Na Figura 6A, estão dispostos os *scores* da análise de componentes principais (PCA), com elipses separando os grupos com grau de confiança de 66%. Portanto, o PCA foi utilizado para determinar variáveis latentes (componentes principais) com base nas variáveis analisadas nos tratamentos. Esses componentes principais (PCs) foram investigados de acordo com sua capacidade de separar os tratamentos conforme suas diferenças e agrupar tratamentos conforme suas similaridades.

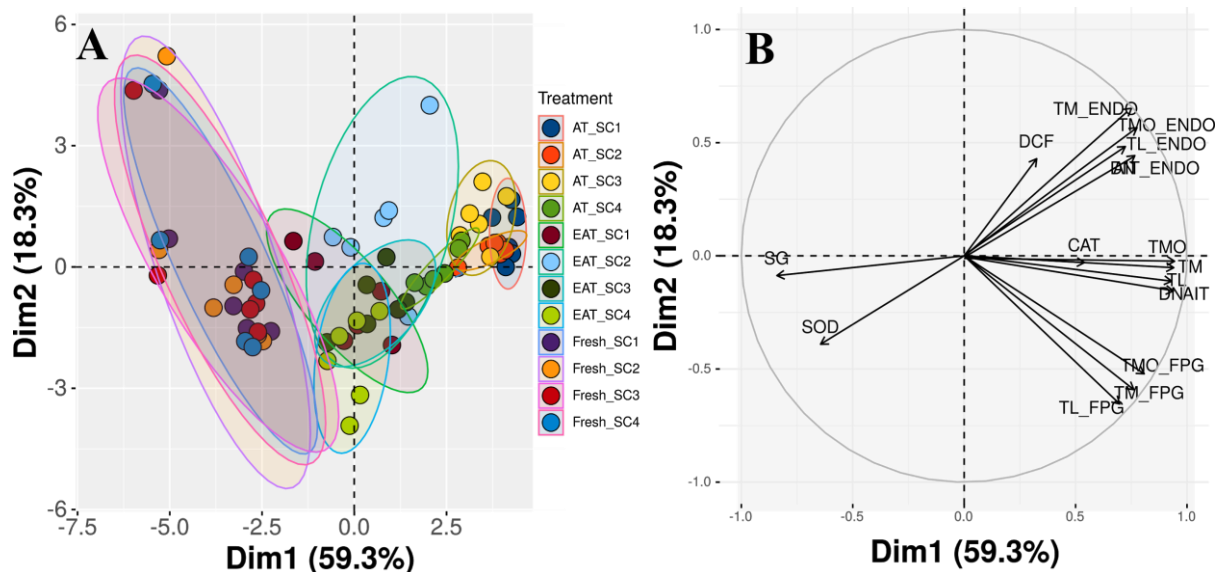


Figura 6. Análise de Componentes Principais (PCA). A) Gráficos de dispersão dos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) para as variáveis analisadas nos quatro tratamentos (SC1, SC2, SC3 e SC4) e nos três diferentes momentos do processo de criopreservação (Fresco, após tempo de equilíbrio e após congelamento/descongelamento). B) As setas marcadas mostram os *loading* dos parâmetros dos tratamentos apresentados nos eixos PC1 e PC2. Legendas: Após aquecimento (AT); Após tempo de equilíbrio (EAT); Sêmen fresco diluído (Fresh); Grupos sulfidrílicos (SG); Superóxido Dismutase (SOD); Diclorofluoresceína diacetato (DCF); Catalase (CAT); Tail Moment (TM); Tail Moment Olive (OTM); Comprimento de cauda do cometa (TL); % de DNA na cauda do cometa (DNAIT); Endonuclease III (ENDO); Formamido Pirimidina Glicosilase (FPG).

Para o PCA, levou-se em consideração apenas os PC com *eigenvalues* ≥ 1 . O primeiro PC, apresentou *eigenvalue* de 9.48 explicando a maior porcentagem da variação total (59,3%) no conjunto de dados. Por outro lado, o segundo PC apresentou *eigenvalue* de 2.93 explicando a segunda maior porcentagem (18,3%). Como pode ser visto na Figura 6A, as amostras pertencentes ao sêmen fresco de todos os tratamentos (SC1, SC2, SC3 e SC4) sofreram um *overlap* e estão dispostos no terceiro e quarto quadrante do gráfico. De acordo com os scores de PC1 e PC2 não forneceram uma separação tão boa dos outros tratamentos, embora todos os tratamentos (SC1, SC2, SC3 e SC4) após o tempo de equilíbrio estão em *overlap* próximos do sêmen fresco. Por outro lado, todos tratamentos (SC1, SC2, SC3 e SC4) após o aquecimento das amostras também estão em *overlap* próximos do agrupamento após o tempo de equilíbrio. Demonstrando que a maior separação dos grupos foi entre o sêmen fresco e o sêmen congelado/descongelado, com a período

após o tempo de equilíbrio sendo um intermediário, independente da solução crioprotetora utilizada.

A correlação das variáveis é mostrado na Figura 6B, sendo que variaram com o primeiro componente principal (PC1) de -0,84 a 0,94. A correlação das variáveis com o segundo componente principal (PC2) variando de -0,43 a 0,66. Correlações importantes foram aquelas acima de 0,60 e abaixo de -0,60. Como tal, as variáveis mais importantes no PC1 foram: Grupos Sulfidrílicos (-0,84), SOD (-0,64), Comprimento de cauda do cometa - FPG (0,70), Tail Moment - FPG (0,76), Comprimento de cauda do cometa - Alcalino (0,93), Tail Moment Olive - Alcalino, % de DNA na cauda - Alcalino e Tail Moment - Alcalino (0,94). A variável mais importante no PC2 foi o Comprimento da cauda do cometa - FPG (0,66).

4. Discussão

No presente estudo, utilizamos a técnica de avaliação da oxidação da diclorofluoresceína diacetato (DCF) para quantificação da geração EROs. As variações observadas nos valores de DCF entre os diferentes tratamentos ao longo do processo de criopreservação, podem estar relacionados com a geração de diferentes tipos de EROs após o tempo de equilíbrio e após o processo de congelamento/descongelamento oriundos dos diferentes componentes das soluções crioprotetoras. Em nosso estudo observamos que nos tratamentos em que foi acrescentado o leite em pó desnatado nas soluções crioprotetoras, os níveis de EROs caíram após o equilíbrio (SC3 e SC4) e após o congelamento/descongelamento das amostras, mas neste último caso apenas no tratamento SC4. Não foi surpresa que a presença do leite em pó nas soluções crioprotetoras possa ter atenuado a geração de EROs durante a criopreservação. Segundo Usta e Yilmaz-Ersan [38] o leite e outros produtos lácteos apresentam ação antioxidante por meio da presença de diversos compostos como a cisteína, vitaminas A e E, e as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase.

A importância do leite pó como um agente antioxidante na solução crioprotetora foi observada nos tratamentos SC4 e SC2, onde o leite em pó estava presente e ausente, respectivamente. Neste caso no tratamento SC2 o aumento sequencial da geração de EROs durante o processo de criopreservação (fresco/após o tempo de equilíbrio/congelamento e descongelamento), contrasta com o observado no tratamento SC4 onde houve uma redução (fresco/ após o tempo de equilíbrio) e

posterior estabilidade dos níveis de EROs (após o tempo de equilíbrio/congelamento e descongelamento). Seguramente, neste caso, a presença do leite em pó desnatado (crioprotetor não permeável) favoreceu a ação do metanol (crioprotetor permeável) na composição da solução crioprotetora SC4. De acordo com Elliot et al. [39], a combinação de crioprotetores permeáveis e não permeáveis é considerado uma boa estratégia na criopreservação. Recentemente Diogo et al. [40] combinando crioprotetores permeáveis e não permeáveis obtiveram bons resultados na criopreservação de sêmen de zebrafish, melhorando o desenvolvimento da prole proveniente de sêmen criopreservado. Cabe ressaltar que a combinação foi favorável na análise de DCF quando combinamos o leite em pó desnatado apenas com o metanol. Não foi possível observar esse desempenho quando a combinação envolveu o Me₂SO, pois houve um aumento nos níveis de DCF após a etapa de congelamento/descongelamento, independente se as amostras foram criopreservadas com Me₂SO como único protetor (SC1) ou quando combinado com o leite em pó desnatado (SC3).

Os grupos sulfidrilas atuam como antioxidantes em sistemas biológicos, eliminando os radicais livres [41]. A quantificação dos grupamentos sulfidrilas (SH) tem sido utilizada para avaliar o potencial antioxidante ativo, pois moléculas que contêm sulfidrilas como as glutationas e a cisteína apresentam ação antioxidante [42]. Em nosso estudo observou-se que a quantidade de SH diminuiu após todas as etapas do processo de criopreservação, indicando maior consumo de SH pela oxidação de proteínas. Esta resposta é semelhante aos resultados de Chatterjee et al. [43], que analisando o grupamento sulfidrilas, encontraram alterações oxidativas nas proteínas dos espermatozoides após a criopreservação de sêmen de touro.

A maior defesa antioxidante no sêmen contra o estresse oxidativo em peixes vem do plasma seminal, devido ao baixo conteúdo citoplasmático nos espermatozoides [44]. As enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) são elementos importantes do sistema de defesa antioxidante, pois de acordo com Köprücü et al. [45] eliminam os ânions superóxido e o peróxido de hidrogênio, respectivamente. Chakraborty et al. [46], classificou a SOD como uma enzima antioxidante de primeira ordem, que atua na conversão do O₂^{•-} (ânion radical superóxido) em H₂O₂. Enquanto a CAT é classificada como uma enzima antioxidante de segunda ordem, já que realiza a decomposição do H₂O₂ em O₂ (oxigênio molecular) e H₂O (água), facilmente liberados pelo organismo [47,48].

Com o sêmen de zebrafish observamos um aumento da atividade da enzima CAT e uma diminuição da enzima SOD após o tempo de equilíbrio e o processo de congelamento/descongelamento. Este comportamento pode ter ocorrido devido ao fato de que durante a criopreservação a ERO mais comumente formada é o peróxido de hidrogênio [5,49], exigindo necessariamente um aumento na atividade de CAT, já que essa enzima é responsável por decompor o peróxido de hidrogênio em moléculas mais facilmente liberadas pelas células. Dois aspectos reforçam nosso entendimento, que no tratamento SC4 o processo de criopreservação foi menos nocivo. Em um primeiro momento, houve aumento significativo da atividade da enzima SOD no tratamento SC4, que em um segundo momento, pode ter contribuído decisivamente para a ainda maior atividade de SOD após o congelamento/descongelamento em relação aos demais tratamentos. De acordo com o Lasso et al. [50] era esperado após o congelamento/descongelamento uma redução dos níveis de atividade da SOD em função do enfraquecimento das barreiras antioxidantes causados pelo processo de criopreservação, o que de fato ocorreu com o sêmen criopreservado do zebrafish. Por outro lado, entendemos que a presença do leite em pó desnatado combinado com o metanol, tornou menos severo o processo e por consequência mais eficiente quanto a proteção das células do excesso de geração de EROs inerentes ao processo de criopreservação. A maior capacidade antioxidante do tratamento SC4, combinando o metanol com o leite em pó é corroborado pela observação de Köprücü et al. [45] que destaca a importância da SOD e CAT para o sistema antioxidante. Assim, quando somamos aos resultados da análise de CAT, evidenciamos a capacidade de proteção ao estresse oxidativo oferecida pelo tratamento SC4, pois o valor observado nessa enzima também foi mais elevado se comparado aos outros tratamentos.

A criopreservação pode causar danos ao DNA espermático através do estresse oxidativo [51] ou pelo choque osmótico [15]. Para Herráez et al. [52] a presença de um estado de estresse oxidativo promovido durante o armazenamento a frio ou congelado é considerado o fator de risco mais relevante na geração de danos ao DNA. De acordo com Slupphaug et al. [53], mais de 20 tipos de danos nas bases do DNA foram encontrados após a exposição ao estresse oxidativo. A manutenção da integridade do DNA, a ser transmitido à prole, é um fator essencial na qualidade dos espermatozoides, pois diminui a chance de mutações ou morte durante o desenvolvimento embrionário de peixes [54,55]. Além disso, é essencial que após a fertilização a informação genética seja transmitida sem erros para a próxima geração,

sendo assim Gosálvez et al. [56] recomendam que avaliação da fragmentação do DNA espermático seja realizada para indicar a qualidade do sêmen.

Para avaliação dos danos no DNA, seguimos a indicação de Kumaravel et al. [57] e Gleib et al. [58] e optamos por utilizar os parâmetros mais recomendados para a análise de ensaio cometa por meio de software (% de DNA na cauda do cometa, comprimento da cauda do cometa, Tail Moment e Olive Tail Moment), pois desta forma facilitamos a comparação de resultados com outras pesquisas, tendo em vista que o parâmetro de avaliação utilizado varia de acordo com a pesquisa. Observou-se no presente estudo que o processo de diluição do sêmen ao extensor não prejudicou o conteúdo de DNA dos espermatozoides, pois o percentual de DNA na cauda do cometa das amostras frescas e diluídas em HBSS foi abaixo de 10%. Esse resultado foi semelhante ao encontrado por Reinardy et al. [59], que encontraram valores de 9 a 12% de DNA fragmentado no sêmen fresco de zebrafish, sem diluir o sêmen em extensor. Apesar do resultado obtido em nosso estudo indicar que não há efeito da diluição do sêmen sobre os danos de DNA, Cabrita et al. [20] relataram que a diluição de sêmen de *Sparus aurata* em uma razão de 1:20 (sêmen:extensor), aumentou os danos ao DNA após a criopreservação.

Em todas variáveis observadas no ensaio cometa padrão, constatamos que os danos no DNA dos espermatozoides aumentam após a exposição aos crioprotetores durante o tempo de equilíbrio, e esses danos, tornam a aumentar significativamente após o processo de congelamento/descongelamento das amostras. Isso permitiu demonstrar que a etapa de congelamento/descongelamento causa os maiores danos ao conteúdo de DNA dos espermatozoides de zebrafish. Por meio do ensaio cometa padrão observou-se que o processo de criopreservação também afetou a estabilidade dos espermatozoides de diversas espécies de peixes como *Nibeia albiflora* [60], *Dicentrarchus labrax* [61], *Sparus aurata* [20], *Oncorhynchus mykiss* [20,62], dentre outros.

De maneira geral, é difícil indicar com clareza a influência das diferentes soluções crioprotetoras na proteção do conteúdo de DNA dos espermatozoides após o tempo e equilíbrio. Além disso, fica clara a importância da inclusão do leite em pó desnatado nas soluções crioprotetoras após o processo de congelamento/descongelamento, tendo em vista que nas amostras criopreservadas com as soluções SC3 e SC4 ocorreram os menores danos ao DNA após criopreservação. Apesar do processo de criopreservação resultar em maiores danos

de DNA nos espermatozoides, a diminuição desses danos nos tratamentos contendo leite em pó é de grande relevância, pois é possível que por esses danos estarem em níveis ainda moderados possam ser reparados pelo oócito durante a embriogênese [20]. Em contrapartida, danos elevados no DNA podem superar a capacidade de reparação dos oócitos, prejudicando o desenvolvimento embrionário e podendo levar a morte do embrião [63].

Ainda que não esteja claro o modo de atuação do leite na proteção das células durante a criopreservação, Bergeron e Manjunath [64], indicam que as micelas de caseína presentes no leite podem proteger os espermatozoides durante a criopreservação por impedir a perda de colesterol e lipídeos das membranas celulares. Outros estudos demonstram que a inclusão de leite em pó na solução crioprotetora melhora os resultados após descongelamento de sêmen de algumas espécies de peixes como *Pseudoplatystoma corruscans* [65] e *Rhamdia quelen* [66]. Além disso, Nakagata [67] constatou que a utilização de leite desnatado ou rafinose na solução crioprotetora melhorou os resultados da criopreservação de sêmen de camundongo.

A criopreservação pode causar não apenas fragmentação do DNA [68], como a oxidação de bases nitrogenadas [69]. No presente estudo, foi possível observar maior presença de danos quando utilizamos o ensaio cometa com a enzima FPG em relação ao observado no ensaio cometa com a enzima ENDO III, indicando maior oxidação de purinas do que de pirimidinas. Contudo, os espermatozoides contêm uma importante enzima específica para reparar danos em purinas, a 8-oxoguanina DNA glicosilase - OGG1 [70], que pode dessa maneira, atenuar os danos observados no ensaio cometa enzimático com FPG. Observamos também que de maneira geral houve maior sensibilidade do ensaio cometa enzimático com FPG e ENDO III do que quando utilizamos o ensaio cometa alcalino padrão. Esse fenômeno ocorre, pois, as enzimas utilizadas no ensaio cometa enzimático, induzem a rupturas adicionais nos locais onde há bases oxidadas e dessa forma revelam danos que o cometa alcalino padrão não demonstra, aumentando assim o DNA fragmentado nos cometas [58]. Entretanto, Pérez-Cerezales et al. [69] não observaram diferenças entre os resultados de fragmentação de DNA obtidos pelo ensaio cometa padrão e o enzimático com FPG em espermatozoides criopreservados de *Oncorhynchus mykiss*, mas quando avaliado a fragmentação de DNA de espermatozoides resfriados a curto prazo, o ensaio

cometa enzimático com FPG apresentou maior fragmentação de DNA do que o ensaio cometa padrão.

Diferentemente do observado no cometa alcalino padrão, não houve diferença entre as soluções crioprotetoras no dano gerado no DNA e analisado nos ensaios cometas enzimáticos com FPG e ENDO III. Embora o tratamento SC4 contendo leite em pó desnatado tenha diminuído a formação de EROs e a fragmentação de DNA avaliada pelo ensaio cometa padrão, além de ter aumentado a atividade enzimática de SOD e CAT, esse não promoveu maior proteção quanto à oxidação de purinas e pirimidinas. Contudo, os danos analisados pelo ensaio cometa modificado por enzimas de restrição (FPG e ENDO III) são danos com potencial mutagênico baixo, podendo ser rapidamente reparados no processo de divisão celular pelo metabolismo normal [12].

De maneira geral a etapa de congelamento/descongelamento das amostras gerou mais danos ao DNA e oxidação de bases do que a etapa de equilíbrio nas soluções crioprotetoras, como observamos pelos resultados do ensaio cometa padrão e enzimático. Da mesma forma em que foi observado em nosso estudo, Cabrita et al. [20] constataram que o processo de congelamento/descongelamento das amostras induziu maiores danos ao DNA do que a toxicidade pela exposição aos crioprotetores, quando avaliaram os danos causados por diferentes etapas do processo de criopreservação de espermatozoides de *Oncorhynchus mykiss* e *Sparus aurata*.

Ao utilizar à análise de componentes principais nos dados obtidos das amostras avaliadas observamos que as interações dos *loadings* nos PC1 e PC2 explicaram 77,6% da variabilidade total dos dados coletados. Embora não mostrado um claro agrupamento entre todos os tratamentos, formaram clusters nos tratamentos quando analisados as amostras de sêmen fresco, e aproximação destes clusters com os formados por todos os tratamentos após o tempo de equilíbrio. Desta forma, pode-se inferir que os maiores danos que levam a maiores alterações dos espermatozoides ocorrem após o processo de congelamento/descongelamento, e não pela toxicidade dos crioprotetores durante o equilíbrio. A utilização da análise de componentes principais é uma ferramenta interessante, por ser um tipo de análise exploratória que pode ajudar na visão geral de como as diversas variáveis em um experimento específico se comportam e com isso podem auxiliar no entendimento dos resultados obtidos, complementando e reforçando as respostas obtidas de maneira separada.

Os resultados benéficos da inclusão de leite em pó na solução crioprotetora na proteção dos espermatozoides quanto os danos oxidativos e ao DNA indicam a necessidade e importância da inclusão de crioprotetor não permeável em combinação com crioprotetores permeáveis em protocolos de criopreservação de sêmen de zebrafish, além disso, abrem a possibilidade de futuros protocolos testarem a combinação entre diferentes crioprotetores não permeáveis, e até a utilização apenas de crioprotetores não permeáveis, visando a diminuição da toxicidade da solução crioprotetora.

Podemos concluir que a combinação entre crioprotetor permeável e não permeável na solução crioprotetora para sêmen de zebrafish, especialmente a combinação do metanol com o leite em pó desnatado, é capaz de diminuir a geração de EROs e aumentar o perfil antioxidante enzimático, através de maior atividade das enzimas SOD e CAT, o que resulta em menores danos ao DNA. Quanto ao processo geral de criopreservação, a etapa de congelamento/descongelamento das amostras é responsável por causar maiores danos oxidativos, inclusive no DNA nos espermatozoides de zebrafish, do que a toxicidade dos crioprotetores durante a exposição na etapa de tempo de equilíbrio.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi apoiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

- [1] R.J. Aitken, S.D. Roman, Antioxidant systems and oxidative stress in the testes., *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1 (2008) 15–24. <https://doi.org/10.4161/oxim.1.1.6843>.
- [2] S. Sadeghi, J. Pertusa, J.L. Yaniz, J. Nuñez, C. Soler, M.A. Silvestre, Effect of different oxidative stress degrees generated by hydrogen peroxide on motility and DNA fragmentation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatozoa, *Reprod. Domest. Anim.* 53 (2018) 1498–1505. <https://doi.org/10.1111/rda.13296>.
- [3] R.J. Aitken, Sperm function tests and fertility, in: *Int. J. Androl.*, 2006: pp. 69–75. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00630.x>.

- [4] A.D. Bui, R. Sharma, R. Henkel, A. Agarwal, Reactive oxygen species impact on sperm DNA and its role in male infertility, *Andrologia*. 50 (2018) e13012. <https://doi.org/10.1111/and.13012>.
- [5] M. Hagedorn, M. McCarthy, V.L. Carter, S.A. Meyers, Oxidative Stress in Zebrafish (*Danio rerio*) Sperm, *PLoS One*. 7 (2012) e39397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039397>.
- [6] Barry Halliwell, John M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine - Oxford Scholarship*, (2007). <https://www.oxfordscholarship.com/view/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001/acprof-9780198717478> (accessed February 26, 2020).
- [7] R.J. AITKEN, J.S. CLARKSON, T.B. HARGREAVE, D.S. IRVINE, F.C.W. WU, Analysis of the Relationship Between Defective Sperm Function and the Generation of Reactive Oxygen Species in Cases of Oligozoospermia, *J. Androl*. 10 (1989) 214–220. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1989.tb00091.x>.
- [8] A. Agarwal, R.K. Sharma, K.P. Nallella, A.J. Thomas, J.G. Alvarez, S.C. Sikka, Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility, *Fertil. Steril*. 86 (2006) 878–885. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.02.111>.
- [9] A.R. Collins, M. Dusinská, C.M. Gedik, R. Stětina, Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker?, *Environ. Health Perspect*. 104 (1996) 465–469. <https://doi.org/10.1289/ehp.96104s3465>.
- [10] M. Glej, N. Habermann, K. Osswald, C. Seidel, C. Persin, G. Jahreis, B.L. Pool-Zobel, Assessment of DNA damage and its modulation by dietary and genetic factors in smokers using the Comet assay: A biomarker model, *Biomarkers*. 10 (2005) 203–217. <https://doi.org/10.1080/13547500500138963>.
- [11] R.F. Lee, S. Steinert, Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals., *Mutat. Res*. 544 (2003) 43–64. [https://doi.org/10.1016/s1383-5742\(03\)00017-6](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(03)00017-6).
- [12] G. Muthusamy, A. Balupillai, K. Govindasamy, K. Ramasamy, V. Ponniresan, I. Malla, R. Nagarajan, Modified comet assays for the detection of cyclobutane pyrimidine dimers and oxidative base damages, *J. Radiat. Cancer Res*. 8 (2017) 82. <https://doi.org/10.4103/0973-0168.199312>.

- [13] E. Cabrita, S. Ma, P. Diogo, S. Martínez-Páramo, C. Sarasquete, M.T. Dinis, The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation, *Anim. Reprod. Sci.* 125 (2011) 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.03.003>.
- [14] L. Fang, C. Bai, Y. Chen, J. Dai, Y. Xiang, X. Ji, C. Huang, Q. Dong, Inhibition of ROS production through mitochondria-targeted antioxidant and mitochondrial uncoupling increases post-thaw sperm viability in yellow catfish, *Cryobiology*. 69 (2014) 386–393. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.09.005>.
- [15] S. Pérez-Cerezales, S. Martínez-Páramo, E. Cabrita, F. Martínez-Pastor, P. de Paz, M.P. Herráez, Evaluation of oxidative DNA damage promoted by storage in sperm from sex-reversed rainbow trout, *Theriogenology*. 71 (2009) 605–613. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.057>.
- [16] G. Wang, N. Kang, H. Gong, Y. Luo, C. Bai, Y. Chen, X. Ji, C. Huang, Q. Dong, Upregulation of uncoupling protein Ucp2 through acute cold exposure increases post-thaw sperm quality in zebrafish, *Cryobiology*. 71 (2015) 464–471. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.08.016>.
- [17] B.P. Best, Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions, *Rejuvenation Res.* 18 (2015) 422–436. <https://doi.org/10.1089/rej.2014.1656>.
- [18] H.C. Box, J.B. Dawidzik, E.E. Budzinski, Free radical-induced double lesions in DNA, *Free Radic. Biol. Med.* 31 (2001) 856–868. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00653-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00653-0).
- [19] C.M.O. Medeiros, F. Forell, A.T.D. Oliveira, J.L. Rodrigues, Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better?, *Theriogenology*. 57 (2002) 327–344. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00674-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00674-4).
- [20] E. Cabrita, V. Robles, L. Rebordinos, C. Sarasquete, M.P. Herráez, Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm, *Cryobiology*. 50 (2005) 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.12.003>.
- [21] M. Matthews, Z.M. Varga, Anesthesia and euthanasia in zebrafish, *ILAR J.* 53 (2012) 192–204. <https://doi.org/10.1093/ilar.53.2.192>.

- [22] J.P. Morris, S. Berghmans, D. Zahrieh, D.S. Neuberg, J.P. Kanki, A.T. Look, Zebrafish sperm cryopreservation with N,N-dimethylacetamide, *Biotechniques*. 35 (2003) 956–968. <https://doi.org/10.2144/03355st03>.
- [23] H. Yang, C. Carmichael, Z.M. Varga, T.R. Tiersch, Development of a simplified and standardized protocol with potential for high-throughput for sperm cryopreservation in zebrafish *Danio rerio*, *Theriogenology*. 68 (2007) 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.02.015>.
- [24] R. Jing, C. Huang, C. Bai, R. Tanguay, Q. Dong, Optimization of activation, collection, dilution, and storage methods for zebrafish sperm, *Aquaculture*. 290 (2009) 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.02.027>.
- [25] C. Bai, X. Wang, G. Lu, L. Wei, K. Liu, H. Gao, C. Huang, Q. Dong, Cooling rate optimization for zebrafish sperm cryopreservation using a cryomicroscope coupled with SYBR14/PI dual staining, *Cryobiology*. 67 (2013) 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.05.011>.
- [26] J.L. Matthews, J.M. Murphy, C. Carmichael, H. Yang, T. Tiersch, M. Westerfield, Z.M. Varga, Changes to extender, cryoprotective medium, and in vitro fertilization improve zebrafish sperm cryopreservation, *Zebrafish*. 15 (2018) 279–290. <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1521>.
- [27] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [28] C.P. LeBel, H. Ischiropoulos, S.C. Bondy, Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress, *Chem. Res. Toxicol.* 5 (1992) 227–231. <https://doi.org/10.1021/tx00026a012>.
- [29] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1959) 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).
- [30] H.P. Misra, I. Fridovich, The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase., *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 3170–3175.

- [31] H. Aebi, [13] Catalase in Vitro, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- [32] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0).
- [33] M. Dušinská, A. Collins, Detection of oxidised purines and UV-induced photoproducts in DNA of single cells, by inclusion of lesion-specific enzymes in the comet assay, (1996).
- [34] A.R. Collins, S.J. Duthie, V.L. Dobson, Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA., *Carcinogenesis.* 14 (1993) 1733–5. <https://doi.org/10.1093/carcin/14.9.1733>.
- [35] K. Końca, A. Lankoff, A. Banasik, H. Lisowska, T. Kuszewski, S. Gózdź, Z. Koza, A. Wojcik, A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay, *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 534 (2003) 15–20.
[https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00251-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00251-6).
- [36] D.N. Tripathi, G.B. Jena, Astaxanthin inhibits cytotoxic and genotoxic effects of cyclophosphamide in mice germ cells, *Toxicology.* 248 (2008) 96–103.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.03.015>.
- [37] P.P. Trivedi, S. Kushwaha, D.N. Tripathi, G.B. Jena, Evaluation of male germ cell toxicity in rats: Correlation between sperm head morphology and sperm comet assay, *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 703 (2010) 115–121.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.08.005>.
- [38] B. Usta, L. Yilmaz-ersan, Sütün Antioksidan Enzimleri ve Biyolojik Etkileri, *J. Agric. Fac. Uludag Univ. Geliş.* 27 (2013) 123–130.
- [39] G.D. Elliott, S. Wang, B.J. Fuller, Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures, *Cryobiology.* 76 (2017) 74–91.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.04.004>.
- [40] P. Diogo, G. Martins, R. Nogueira, A. Marreiros, P.J. Gavaia, E. Cabrita, Cryoprotectants synergy improve zebrafish sperm cryopreservation and offspring

skeletogenesis, *Cryobiology*. 91 (2019) 115–127.

<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.10.001>.

[41] M.J. Taylor, T. Richardson, antioxidant activity of cysteine and protein sulfhydryls in a linoleate emulsion oxidized by hemoglobin, *J. Food Sci.* 45 (1980) 1223–1227. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1980.tb06526.x>.

[42] P.E. Starke-Reed, C.N. Oliver, Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress, *Arch. Biochem. Biophys.* 275 (1989) 559–567. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(89\)90402-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(89)90402-5).

[43] S. Chatterjee, C. Gagnon, Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing, *Mol. Reprod. Dev.* 59 (2001) 451–458. <https://doi.org/10.1002/mrd.1052>.

[44] M. Shiva, A.K. Gautam, Y. Verma, V. Shivgotra, H. Doshi, S. Kumar, Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity, *Clin. Biochem.* 44 (2011) 319–324.

<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.11.009>.

[45] K. Köprücü, S.M. Yonar, E. Şeker, Effects of cypermethrin on antioxidant status, oxidative stress biomarkers, behavior, and mortality in the freshwater mussel *Unio elongatulus eucirrus*, *Fish. Sci.* 76 (2010) 1007–1013.

<https://doi.org/10.1007/s12562-010-0293-8>.

[46] I. Chakraborty, S. Kunti, M. Bandyopadhyay, A. Dasgupta, G.D. Chattopadhyay, S. Chakraborty, Evaluation of serum zinc level and plasma SOD activity in senile cataract patients under oxidative stress, *Indian J. Clin. Biochem.* 22 (2007) 109–113. <https://doi.org/10.1007/BF02913326>.

[47] V. Rajeswari, K. Paliwal, Peroxidase and catalase changes during in vitro adventitious shoot organogenesis from hypocotyls of *Albizia odoratissima* L.f. (Benth), *Acta Physiol. Plant.* 30 (2008) 825–832. <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0187-x>.

[48] M.M. Goyal, A. Basak, Human catalase: Looking for complete identity, *Protein Cell.* 1 (2010) 888–897. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0113-z>.

[49] S. Evangelista-Vargas, A. Santiani, Detection of intracellular reactive oxygen species (superoxide anion and hydrogen peroxide) and lipid peroxidation during

cryopreservation of alpaca spermatozoa, *Reprod. Domest. Anim.* 52 (2017) 819–824. <https://doi.org/10.1111/rda.12984>.

[50] J.L. LASSO, E.E. NOILES, J.G. ALVAREZ, B.T. STOREY, Mechanism of Superoxide Dismutase Loss from Human Sperm Cells during Cryopreservation, *J. Androl.* 15 (1994) 255–265. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1994.tb00444.x>.

[51] L.K. Thomson, S.D. Fleming, R.J. Aitken, G.N. De Iulius, J.-A. Zieschang, A.M. Clark, Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis., *Hum. Reprod.* 24 (2009) 2061–70. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep214>.

[52] M.P. Herráez, J. Ausió, A. Devaux, S. González-Rojo, C. Fernández-Díez, S. Bony, N. Saperas, V. Robles, Paternal contribution to development: Sperm genetic damage and repair in fish, *Aquaculture.* 472 (2017) 45–59. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.007>.

[53] G. Slupphaug, B. Kavli, H.E. Krokan, The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage, in: *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, Elsevier, 2003: pp. 231–251. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.06.002>.

[54] J. Bobe, C. Labbé, Egg and sperm quality in fish, *Gen. Comp. Endocrinol.* 165 (2010) 535–548. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.011>.

[55] R. Santos, M. Palos-Ladeiro, A. Besnard, J.M. Porcher, S. Bony, W. Sanchez, A. Devaux, Relationship between DNA damage in sperm after ex vivo exposure and abnormal embryo development in the progeny of the three-spined stickleback, *Reprod. Toxicol.* 36 (2013) 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.11.004>.

[56] J. Gosálvez, C. López-Fernández, A. Hermoso, J.L. Fernández, M.E. Kjelland, Sperm DNA fragmentation in zebrafish (*Danio rerio*) and its impact on fertility and embryo viability - Implications for fisheries and aquaculture, *Aquaculture.* 433 (2014) 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.036>.

[57] T.S. Kumaravel, B. Vilhar, S.P. Faux, A.N. Jha, Comet Assay measurements: A perspective, *Cell Biol. Toxicol.* 25 (2009) 53–64. <https://doi.org/10.1007/s10565-007-9043-9>.

- [58] M. Gleib, T. Schneider, W. Schlörmann, Comet assay: an essential tool in toxicological research, *Arch. Toxicol.* 90 (2016) 2315–2336. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1767-y>.
- [59] H.C. Reinardy, E. Skippins, T.B. Henry, A.N. Jha, Assessment of DNA damage in sperm after repeated non-invasive sampling in zebrafish *Danio rerio*, *J. Fish Biol.* 82 (2013) 1074–1081. <https://doi.org/10.1111/jfb.12042>.
- [60] T. Dai, E. Zhao, G. Lu, K. Che, Q. He, Y. Lu, Q. Fang, H. Wang, L. Zheng, S. Li, C. Huang, Q. Dong, Sperm cryopreservation of yellow drum *Nibea albiflora*: A special emphasis on post-thaw sperm quality, *Aquaculture*. 368–369 (2012) 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.09.017>.
- [61] L. Zilli, R. Schiavone, V. Zonno, C. Storelli, S. Vilella, Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation, *Cryobiology*. 47 (2003) 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2003.10.002>.
- [62] C. Labbe, A. Martoriati, A. Devaux, G. Maise, Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout, *Mol. Reprod. Dev.* 60 (2001) 397–404. <https://doi.org/10.1002/mrd.1102>.
- [63] S. Pérez-Cerezales, S. Martínez-Páramo, J. Beirão, M.P. Herráez, Fertilization capacity with rainbow trout DNA-damaged sperm and embryo developmental success, *Reproduction*. 139 (2010) 989–997. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0037>.
- [64] A. Bergeron, P. Manjunath, New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk, *Mol. Reprod. Dev.* 73 (2006) 1338–1344. <https://doi.org/10.1002/mrd.20565>.
- [65] J. Carolsfeld, H.P. Godinho, E. Zaniboni Filho, B.J. Harvey, Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation, *J. Fish Biol.* 63 (2003) 472–489. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00170.x>.
- [66] M.S. Adames, C.P.R. de Toledo, G. Neumann, A.H. Buzzi, C.N. Buratto, P.A. Piana, R.A. Bombardelli, Optimization of the sperm: Oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator, *Anim. Reprod. Sci.* 161 (2015) 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.08.014>.

- [67] N. Nakagata, Production of normal young following transfer of mouse embryos obtained by in vitro fertilization between cryopreserved gametes, *J. Reprod. Fertil.* 99 (1993) 77–80. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0990077>.
- [68] C. Tatone, G. Di Emidio, M. Vento, R. Ciriminna, P.G. Artini, Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells, *Gynecol. Endocrinol.* 26 (2010) 563–567. <https://doi.org/10.3109/09513591003686395>.
- [69] S. Martínez-Páramo, V. Barbosa, S. Pérez-Cerezales, V. Robles, M.P. Herráez, Cryoprotective effects of antifreeze proteins delivered into zebrafish embryos, *Cryobiology.* 58 (2009) 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.11.013>.
- [70] T.A. Rosenquist, D.O. Zharkov, A.P. Grollman, Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 7429–7434. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.14.7429>.

CAPÍTULO V

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversos protocolos de criopreservação com tecidos e células reprodutivas de zebrafish já foram aplicados, estabelecendo metodologias eficientes durante o processo de criopreservação. Contudo, ainda há uma carência de resultados positivos em alguns aspectos, como a criopreservação do genoma diploide, que ainda não foi possível pelos insucessos na criopreservação de embriões. A criopreservação de células primordiais é promissora e provavelmente mais pesquisas nesse sentido vão ser realizadas nos próximos anos. A criopreservação do genoma feminino já apresenta alguns resultados positivos, contudo, os sucessos obtidos até então dizem respeito apenas a criopreservação de oócitos imaturos o que impossibilita o seu uso após descongelamento/aquecimento das amostras para fertilização. Nesse sentido, estudos desenvolvendo a maturação dos oócitos *in vitro* ou o estabelecimento de novos protocolos que consigam preservar os oócitos maduros viáveis após criopreservação parecem ser as metas a serem atingidas nos próximos estudos.

A criopreservação de sêmen de zebrafish apresenta alguns obstáculos e as dificuldades enfrentadas fazem com que os resultados obtidos sejam variáveis. Porém, resultados positivos já estão disponíveis na literatura a criopreservação de sêmen já é empregada para manutenção de bancos de germoplasma da espécie. Como a criopreservação de sêmen se apresenta como a mais estabelecida para a espécie, é possível observar esforços de diversos pesquisadores no sentido de otimizar os resultados obtidos após a criopreservação, e essa tendência deve continuar no futuro.

Observou-se nos protocolos de criopreservação de sêmen testados nesse trabalho, que diversas são as fontes de danos aos espermatozoides durante a criopreservação. Ficou evidente que a etapa de congelamento/descongelamento foi o momento em que ocorreu os maiores danos aos espermatozoides durante o processo de criopreservação, e que os danos oxidativos e de DNA foram importantes durante todo o processo. A utilização da combinação entre crioprotetor permeável e não permeável demonstrou ser uma estratégia interessante nesse estudo, quando foi utilizado o leite em pó desnatado como crioprotetor não permeável, os danos observados foram menores, principalmente no que diz respeito aos danos oxidativos e de DNA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMADI, A.; SONN-CHYE, N. Fertilizing ability of DNA damaged spermatozoa. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 284, n. 6, p. 696-704, 1999.
- AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 81, n. 2, p. 459-469, 1987.
- AITKEN, R. J.; ROMAN, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, London, v. 1, n. 1, p. 15-24, 2008.
- ALAVI, S. M.; COSSON, J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. **Cell Biology International**, London, v. 30, n. 1, p. 1-14, 2006.
- ASTURIANO, J. F.; CABRITA, E.; HORVÁTH, Á. Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: a mini-review. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 245, p. 69-76, 2017.
- BAI, C. *et al.* Cooling rate optimization for zebrafish sperm cryopreservation using a cryomicroscope coupled with SYBR14/PI dual staining. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 67, n. 2, p. 117-123, 2013.
- BALL, B. A.; VO, A. T. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 22, n. 6, p. 1061-1069, 2001.
- BENSON, J. D. *et al.* The cryobiology of spermatozoa. **Theriogenology**, New York, v. 78, n. 8, p. 1682-1699, 2012.
- BEST, B. P. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. **Rejuvenation Research**, Larchmont, v.18, n. 5, p. 422-436, 2015.
- BILLARD, R.; COSSON, M. P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 261, n. 2, p. 122-131, 1992.
- BLAXTER, J.H.S. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. **Nature**, London, v. 172, p. 1189-1190, 1953.
- BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 165, n. 3, p. 535-548, 2010.
- BOX, H. C.; DAWIDZIK, J. B.; BUDZINSKI, E. E. Free radical-induced double lesions in DNA. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 31, n. 7, p. 856-868, 2001.

BUEGE, J. A.; AUST, S. A. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v. 52, n. 3, p. 302-310, 1975.

BUI, A. D. *et al.* Reactive oxygen species impact on sperm DNA and its role in male infertility. **Andrologia**, New York, v. 50, n. 8, [art.] e13012, 2018.

CABRITA, E. *et al.* Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **Journal of Applied Ichthyology**, Hamburg, v. 26, n. 5, p. 623-635, 2010.

CABRITA, E. *et al.* The influence of certain amino acids and vitamins in post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 125, n. 1/4, p. 189-195, 2011.

CARMICHAEL, C.; WESTERFIELD, M.; VARGA, Z. M. Cryopreservation and in vitro fertilization at the Zebrafish International Resource Center. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 546, p. 45-65, 2009.

CATALÁ, A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Amsterdam, v. 38, n. 9, p. 1482-1495, 2006.

CHAKRABORTY, I. *et al.* Evaluation of serum zinc level and plasma SOD activity in senile cataract patients under oxidative stress. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, Patna, v. 22, n. 2, p. 109-113, 2007.

CHAO, N-H.; LIAO, I. C. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. **Aquaculture**, Amsterdam, v.197, n. 1/4, p.161-189, 2001.

COLLINS, A. R. *et al.* Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 104, n. 3, p. 465-469, 1996.

DARROW, K. O.; HARRIS, W. Characterization and development of courtship in Zebrafish, *Danio rerio*. **Zebrafish**, Larchmont, v. 1, n. 1, p. 40-45, 2004.

DIOGO, P. *et al.* Electric ultrafreezer (-150°C) as an alternative for zebrafish sperm cryopreservation and storage. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 44, n. 6, p. 1443-1455, 2018.

DIOGO, P. *et al.* Cryoprotectants synergy improve zebrafish sperm cryopreservation and offspring skeletogenesis. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 91, p. 115-127, 2019.

DRAPER, B. W. *et al.* A high-throughput method for identifying N-Ethyl-N-Nitrosourea (ENU)-induced point mutations in zebrafish. **Methods in Cell Biology**, New York, v. 77, p. 91-112, 2004.

DRAPER, B. W.; MOENS, C. B. A high-throughput method for zebrafish sperm cryopreservation and in vitro fertilization. **JOVE: Journal of Visualized Experiments**, Boston, v. 29, p. 1395-1340, 2009.

EATON, R. C.; FARLEY, R. D. Spawning cycle and egg production of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in the laboratory. **Copeia**, New York, v. 1974, n. 1, p.195-204, 1974.

ELLIOTT, G. D.; WANG, S.; FULLER, B. J. Cryoprotectants: a review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 76, p. 74-91, 2017.

ENGESZER, R. E. *et al.* Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. **Zebrafish**, Larchmont, v. 4, n. 1, p. 21-40, 2007.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 11, n. 1, p. 81-128, 1991.

FAHY, G. M. Theoretical considerations for oocyte cryopreservation by freezing. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 14, n. 6, p. 709-714, 2007.

FAHY, G. M. Cryoprotectant toxicity neutralization. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 60, p. 45-53, 2010. Supl. 3.

FAUVEL, C.; SUQUET, M.; COSSON, J. Evaluation of fish sperm quality. **Journal of Applied Ichthyology**, Hamburg, v. 26, n. 5, p. 636-643, 2010.

GADEA, J. *et al.* Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation: effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Theriogenology**, New York, v. 62, n. 3/4, p. 690-701, 2004.

GAO, D.; CRITSER, J. K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. **ILAR Journal**, Washington, DC, v. 41, n. 4, p.187-196, 2000.

GINSBURG, A. S. Sperm-egg association and its relationship to the activation of the egg in salmonid fishes. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, Cambridge, v.11, p.13-33, 1963.

GOSÁLVEZ, J. *et al.* Sperm DNA fragmentation in zebrafish (*Danio rerio*) and its impact on fertility and embryo viability — Implications for fisheries and aquaculture. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 433, p. 173-182, 2014.

GRAHAM, C.; VON KEYSERLINGK, M. A. G.; FRANKS, B. Zebrafish welfare: natural history, social motivation and behavior. **Applied Animal Behavior Science**, Amsterdam, v. 200, p. 13-22, 2018.

GUAN, M.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes by vitrification. **CryoLetters**, London, v. 31, n. 3, p. 230-238, 2010.

GUERRIERO, G.; DI FINIZIO, A.; GARCIA, G. Stress induced changes of plasma antioxidants in aquatic sea bass, *Dicentrarchus labrax*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 132, n. 1, p. 205-211, 2002.

HAGEDORN, M. *et al.* Oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*) sperm. **PlosOne**, San Francisco, v. 7, p. 1-11, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4th ed. New York: Clarendon Press, 2007.

HAMMADEH, M. E. *et al.* Evaluation of cryoinjury of spermatozoa after slow (programmed biological freezer) or rapid (liquid nitrogen vapour) freeze–thawing techniques. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, New York, v.18, n. 7, p. 364-370, 2001.

HARVEY, B.; KELLEY, R. N.; ASHWOOD-SMITH, M. J. Cryopreservation of zebrafish (*Brachydanio rerio*) spermatozoa using methanol. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 60, p. 1867-1870, 1982.

HERRÁEZ, M. P. *et al.* Paternal contribution to development: spermgenetic damage and repair in fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 472, p. 45-59, 2017.

HOWE, K. *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, London, v. 496, n. 7446, p. 498-503, 2013.

HUANG, C.; DONG, Q.; TIERSCH, T. R. Sperm cryopreservation of a live-bearing fish, the platyfish *Xiphophorus couchianus*. **Theriogenology**, New York, v. 62, n. 6, p. 971-989, 2004.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 46, n. 3, p. 205-229, 2003.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 9, n. 6, p. 515-540, 1990.

JING, R. *et al.* Optimization of activation, collection, dilution, and storage methods for zebrafish sperm. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 290, n. 1/2, p. 165-171, 2009.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorder. **Trend in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 35, n. 2, p. 63-75, 2014.

KIME, D. E. *et al.* Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative Pharmacology and Toxicology**, New York, v. 130, n. 4, p. 425-433, 2001.

KIMMEL, C. B. *et al.* Stages of embryonic-development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, New York, v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995.

KINTH, P.; MAHESH, G.; PANWAR, Y. Mapping of zebrafish research: a global outlook. **Zebrafish**, Larchmont, v. 10, n. 4, p. 510-517, 2013.

KURTZMAN, M. S. *et al.* Sexually segregated housing results in improved early larval survival in zebrafish. **Lab Animal**, New York, v. 39, n. 6, p. 183-189, 2010.

LABBÉ, C. *et al.* Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 60, n. 3, p. 397-404, 2001.

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

LI, J.; LIU, Q.; ZHANG, S. Evaluation of the damage in fish spermatozoa cryopreservation. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, Beijing, v. 24, p. 370-377, 2006.

LI, P. *et al.* Evaluating the impacts of osmotic and oxidative stress on common carp (*Cyprinus carpio*, L.) sperm caused by cryopreservation techniques. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 83, n. 5, p. 852-858, 2010.

MAACK, G.; SEGNER, H. Morphological development of the gonads in zebrafish. **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 62, n. 4, p. 895-906, 2003.

MANSOUR, N.; MCNIVEN, M. A.; RICHARDSON, G. F. The effect of dietary supplementation with blueberry, [alpha]-tocopherol or astaxanthin on oxidative stability of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) semen. **Theriogenology**, New York, v. 66, n. 2, p. 373-382, 2006.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S. *et al.* Cryobanking of aquatic species. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 472, p. 156-177, 2017.

MATTHEWS, J. L. *et al.* Changes to extender, cryoprotective medium, and in vitro fertilization improve zebrafish sperm cryopreservation. **Zebrafish**, Larchmont, v. 15, n. 3, p. 279-290, 2018.

MAZUR, P.; LEIBO, S. P.; CHU, E. H. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. **Experimental Cell Research**, Orlando, v. 71, n. 2, p. 345-55, 1972.

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**, Clifton, v. 6, n. 3, p. 197-213, 1984.

MONTEIRO, M. *et al.* Acute effects of 3,4-dichloroaniline on biomarkers and spleen histology of the common goby *Pomatoschistus microps*. **Chemosphere**, Oxford, v. 62, n. 8, p. 1333-1339, 2006.

MORRIS, J. P. *et al.* Zebrafish sperm cryopreservation with N-Ndimethylacetamide. **BioTechniques**, London, v. 35, n. 5, p. 956-958, 2003.

MUTHUSAMY, G. *et al.* Modified comet assays for the detection of cyclobutene pyrimidine dimers and oxidative base damages. **Journal of Radiation and Cancer Research**, Mumbai, v. 8, n. 1, p. 82-86, 2017.

NASIADKA, A.; CLARK, M. D. Zebrafish breeding in the laboratory environment. **ILAR Journal**, Oxford, v. 53, n. 2, p.161-168, 2012.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.

PAULL, G. C. *et al.* Dominance hierarchies in zebrafish (*Danio rerio*) and their relationship with reproductive success. **Zebrafish**, Larchmont, v. 7, n. 1, p. 109-117, 2010.

PÉREZ-CEREZALES, S. *et al.* Evaluation of oxidative DNA damage promoted by storage in sperm from sex-reversed rainbow trout. **Theriogenology**, New York, v. 71, n. 4, p. 605-613, 2009.

PRUCHNIAK, M. P.; ARAZNA, M.; DEMKOW, U. Biochemistry of oxidative stress. *In*: POKORSKI, M. (ed.). **Advances in clinical science**. Cham: Springer, 2015. p. 9-19.

RAJESWARI, V.; PALIWAL, K. Peroxidase and catalase changes during in vitro adventitious shoot organogenesis from hypocotyls of *Albizia odoratissima* L.f. (Benth). **Acta Physiologiae Plantarum**, Warszawa, v. 30, n. 6, p. 825-832, 2008.

RANSOM, D. G.; ZON, L. I. Appendix 3 collection, storage, and use of zebrafish sperm. **Methods in Cell Biology**, New York, v. 60, p. 365-372, 1999.

ROSATO, M. P.; IAFFALDANO, N. Cryopreservation of rabbit semen: comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. **Theriogenology**, New York, v. 79, n. 3, p. 508-516, 2013.

SANTOS, R. *et al.* Relationship between DNA damage in sperm after ex vivo exposure and abnormal embryo development in the progeny of the three-spined stickleback. **Reproductive Toxicology**, Elmsford, v. 36, p. 6-11, 2013.

SILVA, C. C. *et al.* An easy method for cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) sperm. **Zebrafish**, Larchmont, v. 16, n. 3, p. 321-323, 2019.

SINGH, N. P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, Orlando, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SHIVA, M. *et al.* Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. **Clinical Biochemistry**, Tarrytown, v. 44, n. 4, p. 319-324, 2011.

SLATER, T. F. Free radical mechanisms in tissue injury. **Biochemical Journal**, London, v. 222, n. 1, p. 1-15, 1984.

SPENCE, R. *et al.* The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews**, London, v. 83, n. 1, p. 13-34, 2008.

SUQUET, M. *et al.* Cryopreservation of sperm in marine fish. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 231-243, 2000.

TIERSCH, T. R. Cryopreservation in aquarium fishes. **Marine Biotechnology**, New York, v. 3, p. 212-223, 2001. Supl. 1.

TSAI, S.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Development of in vitro culture method for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles for use in cryopreservation studies. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 74, n. 2, p. 290-303, 2010.

ULLOA, P. E. *et al.* Zebrafish as a model organism for nutrition and growth: towards comparative studies of nutritional genomics applied to aquacultured fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, Andover, v. 21, n. 4, p. 649-666, 2011.

VALENÇA, R. M. B.; GUERRA, M. M. P. Espécies reativas ao oxigênio (ROS) e utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, p. 47-53, 2007.

WANG, Y. *et al.* Evaluation of the comet assay for assessing the dose-response relationship of DNA damage induced by ionizing radiation. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, n. 11, p. 22449-22461, 2013.

WANG, G. *et al.* Upregulation of uncoupling protein Ucp2 through acute cold exposure increases post-thaw sperm quality in zebrafish. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 71, n. 3, p. 464-471, 2015.

XIAO, J. *et al.* Effects of the insemination of hydrogen peroxide-treated epididymal mouse spermatozoa on γ H2AX repair and embryo development. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 6, [art.] e38742, [p. 1-8], 2012.

XIN, M. *et al.* Progress and challenges of fish sperm vitrification: a mini review. **Theriogenology**, New York, v. 98, p. 16-22, 2017.

YANG, H. *et al.* Development of a simplified and standardized protocol with potential for high-throughput for sperm cryopreservation in zebrafish *Danio rerio*. **Theriogenology**, New York, v. 68, n. 2, p. 128-136, 2007.

YANG, H. *et al.* A procedure-spanning analysis of plasma membrane integrity for assessment of cell viability in sperm cryopreservation of Zebrafish *Danio rerio*. **Zebrafish**, Larchmont, v. 13, n. 2, p. 144-151, 2016.

YOSSA, R. *et al.* A practical approach for sexing zebrafish, *Danio rerio*. **Journal of Applied Aquaculture**, New York, v. 25, n. 2, p. 148-153, 2013.

ZILLI, L. *et al.* Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 47, n. 3, p. 227-235, 2003.

ZHAO, J. *et al.* The potential value of the neutral comet assay and γ H2AX foci assay in assessing the radio sensitivity of carbon beam in human tumor cell lines. **Radiology and Oncology**, Ljubljana, v. 47, n. 3, p. 247-257, 2013.

APÊNDICES

Apêndice 1 – Normas do periódico *Reviews in Aquaculture*

1. SUBMISSION

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at <https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html>.

Note that submission implies that the content has not been published or submitted for publication elsewhere except as a brief abstract in the proceedings of a scientific meeting or symposium.

Once you have prepared your submission in accordance with the Guidelines, manuscripts should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/raq>

The submission system will prompt you to use an ORCID (a unique author identifier) to help distinguish your work from that of other researchers. Click [here](#) to find out more.

Cover letter

- A cover letter containing an authorship statement should be included in the 'Cover Letter Field' of the ScholarOne system. The text can be entered directly into the field or uploaded as a file.
- The covering letter authorship statement should include an acknowledgement that all authors have contributed significantly, and confirm that all authors are in agreement with the content of the manuscript. Authors must declare any financial support or relationships that may pose conflict of interest.

We look forward to your submission.

2. AIMS AND SCOPE

The primary aim of *Reviews in Aquaculture* is to provide a forum of reviews on developments in aquaculture techniques, policies and planning. The Journal will publish fully peer-reviewed review articles, invited or otherwise, on major aspects pertaining to aquaculture, including: global, regional and/or national production and market trends; aquaculture practices and technological developments; aquaculture–environment interactions; indigenous and alien species in aquaculture; the biology and culture of aquaculturally important and emerging species; utilization of primary and secondary resources in aquaculture; developments in artificial propagation of individual species and/or groups; developments in feeds and feeding; genetics and aquaculture; health management in aquaculture; policy developments pertaining to aquaculture; aquaculture product quality and traceability; and socio-economics of aquaculture and impacts.

3. PREPARING YOUR MANUSCRIPT

Style

Spelling. The journal uses UK spelling and authors should therefore follow the latest edition of the *Concise Oxford Dictionary*.

Units. All measurements must be given in SI or SI-derived units.

Abbreviations. Abbreviations should be used sparingly – only where they ease the reader's task by reducing repetition of long, technical terms. Initially use the word in full, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter use the abbreviation only.

Trade names. Chemical substances should be referred to by the generic name only. Trade names should not be used.

Zoological nomenclature. All papers must conform to the latest edition of the International Code of Zoological Nomenclature. Upon its first use in the title, abstract and text, the common name of a species should be followed by the scientific name (genus, species and authority) in parentheses. Genus names should not be abbreviated at the beginning of paragraphs.

Nucleotide sequence data can be submitted in electronic form to any of the three major collaborative databases: DDBJ, EMBL or GenBank. It is only necessary to submit to one database as data are exchanged between DDBJ, EMBL and GenBank on a daily basis. The suggested wording for referring to accession-number information is: 'These sequence data have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number U12345.'

Addresses are as follows:

<i>DNA</i>	<i>Data</i>	<i>Bank</i>	<i>of</i>	<i>Japan</i> (DDBJ)	http://www.ddbj.nig.ac.jp
<i>EMBL</i>	<i>Nucleotide</i>	<i>Sequence</i>		<i>Submissions</i>	http://www.ebi.ac.uk
<i>GenBank</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov				

Parts of the Manuscript

The manuscript should be submitted in separate files: title page; main text file; figures. Line numbers should be added to all pages of the manuscript.

Title page

The title page should contain (i) a short informative title that contains the major key words. The title should not contain abbreviations; (ii) the full names of the authors; (iii) the author's institutional affiliations at which the work was carried out; (iv) the full postal and email address, plus telephone number, of the author to whom correspondence about the manuscript should be sent; (v) a short running title (40 characters). The present address of any author, if different from that where the work was carried out, should be supplied in a footnote.

Main text

As papers are double-blind peer reviewed the main text file should not include any information that might identify the authors. The main text of the manuscript should be presented in the following order: (i) abstract and key words, (ii) text, (iii) acknowledgements, (iv) references, (v) appendices, (vi) tables (each table complete with title and footnotes), (vii) figure legends. Figures and supporting information should be submitted as separate files. Footnotes to the text are not allowed and any such material should be incorporated into the text as parenthetical matter.

Abstract and key words

Articles must have a brief abstract that states in 250 words or fewer the purpose, basic procedures, main findings and principal conclusions of the study. The abstract should not contain abbreviations or references.

Five key words (for the purposes of indexing) should be supplied below the abstract in alphabetical order.

Text

The text should be organized into an introductory section, conveying the background and purpose of the paper, and then into sections identified with subheadings, as appropriate.

Acknowledgements

The source of financial grants and other funding must be acknowledged, including a frank declaration of the authors' industrial links and affiliations. The contribution of colleagues or institutions should also be acknowledged. Personal thanks and thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

References

All references cited in the manuscript should be included in the Reference list, and all references included in the Reference list should be cited in-text. It is the responsibility of the author to provide accurate references.

The Harvard (author, date) system of referencing is used (examples are given below). In the text give the author's name followed by the year in parentheses: Smith (2000). If there are two authors use 'and': Smith and Jones (2001); but if cited within parentheses use '&': (Smith & Jones 2001). When reference is made to a work by three or more authors, the first name followed by *et al.* should be used: MacDonald *et al.* (2002). In the reference list, references should be listed in alphabetical order.

In the reference list, cite the names of all authors when there are six or fewer; when seven or more, list the first six followed by *et al.* Do not use *ibid.* or *op cit.* Reference to unpublished data and personal communications should not appear in the list but should be cited in the text only (e.g. Robert Smith, pers. comm., 2005). All citations mentioned in the text, tables or figures must be listed in the reference list.

Authors are responsible for the accuracy of the references.

Journal article

Utting SD (1986) A preliminary study on growth of *Crassostrea gigas* larvae and spat in relation to dietary protein. *Aquaculture* **56**: 123–135.

Online article not yet published in an issue

An online article that has not yet been published in an issue (therefore has no volume, issue or page numbers) can be cited by its Digital Object Identifier (DOI). The DOI will remain valid and allow an article to be tracked even after its allocation to an issue. Glencross BD (2009) Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Aquaculture* doi: 10.1111/j.1753-5131.2009.01006.x

Book

Ringsven MK, Bond D (1996) *Aquaculture Systems in Thailand*, 2nd edn. Delmar Publishers, Albany, NY.

Chapter in a book

Chapman DW (1971) Production. In: Ricker WS (ed.) *Methods of the Assessment of Fish Production in Freshwater*, pp. 199–214. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Tables

Tables should be self-contained and complement, but not duplicate, information contained in the text. Number tables consecutively in the text in Arabic numerals. Type tables on a separate page with the legend above. Legends should be concise but comprehensive – the table, legend and footnotes must be understandable without reference to the text. Vertical lines should not be used to separate columns. Column headings should be brief, with units of measurement in parentheses; all abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and *, **, *** should be reserved for *P*-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

Figure legends

Type figure legends on a separate page. Legends should be concise but comprehensive – the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement. Magnifications should be indicated using a scale bar on the illustration. Figures will be reproduced in colour online.

Preparing Figures

Although we encourage authors to send us the highest-quality figures possible, for peer-review purposes we are happy to accept a wide variety of formats, sizes, and resolutions.

Click here for the basic figure requirements for figures submitted with manuscripts for initial peer review, as well as the more detailed post-acceptance figure requirements.

Equations

Equations should be numbered sequentially with Arabic numerals; these should be ranged right in parentheses. All variables should appear in italics. Use the simplest possible form for all mathematical symbols.

Appendices

These should be placed at the end of the paper, numbered in Roman numerals and referred to in the text. If written by a person other than the author of the main text, the writer's name should be included below the title.

4. EDITORIAL AND ETHICAL CONSIDERATIONS

Editorial Review and Acceptance

Except where otherwise stated, manuscripts are peer reviewed by two anonymous reviewers and the Editors. Final acceptance or rejection rests with the Editorial Board, who reserves the right to refuse any material for publication.

Manuscripts should be written in a clear, concise, direct style. Where contributions are judged as acceptable for publication on the basis of content, the Editors and the Publisher reserve the right to modify typescripts to eliminate ambiguity and repetition and improve communication between author and reader.

Authorship Policy

All listed authors must have contributed significantly, and all authors are in agreement with the content of the manuscript.

Principles for Publication of Research Involving Human Subjects

Manuscripts must contain a statement to the effect that all human studies have been reviewed by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in an appropriate version of the Declaration of Helsinki (as revised in Brazil 2013), available at <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>. It should also state clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under the study should be omitted.

Use of Animals in Research

Any experiments involving animals must be demonstrated to be ethically acceptable and where relevant conform to national guidelines for animal usage in research.

Data Sharing and Data Accessibility

The journal encourages authors to share the data and other artefacts supporting the results in the paper by archiving it in an appropriate public repository. Authors should include a data accessibility statement, including a link to the repository they have used, in order that this statement can be published alongside their paper.

Publication Ethics

This journal is a member of the **Committee on Publication Ethics (COPE)**. Note this journal uses iThenticate's CrossCheck software to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts. Read our Top 10 Publishing Ethics Tips for Authors **here**. Wiley's Publication Ethics Guidelines can be found at <https://authorservices.wiley.com/ethics-guidelines/index.html>

5. AUTHOR LICENSING

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author will receive an email prompting them to log in to Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be required to complete a copyright license agreement on behalf of all authors of the paper.

Authors may choose to publish under the terms of the journal's standard copyright agreement, or **OnlineOpen** under the terms of a Creative Commons License.

General information regarding licensing and copyright is available [here](#). To review the Creative Commons License options offered under OnlineOpen, please [click here](#). (Note that certain funders mandate that a particular type of CC license has to be used; to check this please click [here](#).)

Self-Archiving definitions and policies. Note that the journal's standard copyright agreement allows for self-archiving of different versions of the article under specific conditions. Please click here for more detailed information about self-archiving definitions and policies.

Open Access fees: If you choose to publish using OnlineOpen you will be charged a fee. A list of Article Publication Charges for Wiley journals is available [here](#).

Funder Open Access: Please click [here](#) for more information on Wiley's compliance with specific Funder Open Access Policies.

6. PUBLICATION PROCESS AFTER ACCEPTANCE

Accepted article received in production

When your accepted article is received by Wiley's production team, you (corresponding authors) will receive an email asking you to login or register with **Author Services**. You will be asked to sign a publication licence at this point.

Proofs

Once your paper is typeset you will receive email notification of the URL from where to download a PDF typeset page proof, associated forms and full instructions on how to correct and return the file. Please note that you are responsible for all statements made in your work, including changes made during the editorial process and thus you must check your proofs carefully. Note that proofs should be returned 48 hours from receipt of first proof.

Early View

The journal offers rapid speed to publication via Wiley's Early View service. **Early View** (Online Version of Record) articles are published on Wiley Online Library before inclusion in an issue. Note there may be a delay after corrections are received before your article appears online, as Editors also need to review proofs. Once your article is published on Early View no further changes to your article are possible. Your Early View article is fully citable and carries an online publication date and DOI for citations.

7. POST PUBLICATION

Access and sharing

When your article is published online:

- You receive an email alert (if requested).
- You can share your published article through social media.
- As the author, you retain free access (after accepting the Terms & Conditions of use, you can view your article).
- The corresponding author and co-authors can nominate up to ten colleagues to receive a publication alert and free online access to your article.

You can now order print copies of your article (instructions are sent at proofing stage).

Now is the time to start promoting your article. Find out how to do that [here](#).

Measuring the impact of your work

Wiley also helps you measure the impact of your research through our specialist partnerships with **Kudos** and **Altmetric**.

PUBLICATION FORMAT

Reviews in Aquaculture is published in electronic format only.

8. EDITORIAL OFFICE CONTACT DETAILS

Sena De Silva

Editorial Office, *Reviews in Aquaculture*

School of Life & Environmental Sciences

Deakin University

Victoria, Australia

Email: sena.desilva@deakin.edu.au

Author Guidelines updated 10 February 2017

Apêndice 2 – Normas do periódico 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.

Aims and Scope

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 Articles

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.

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Page charges

This journal has no page charges.

Submission Checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

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

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

It is recommended that the manuscript should be submitted in Word document

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- 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 Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for

potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under 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, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#)

Authorship

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

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, 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. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already

been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). 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. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. 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.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided 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 the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our Open Access page from the Journal Homepage for more information.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <https://ees.elsevier.com/therio/default.asp>.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

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. 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. 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. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Pages and lines should be numbered.

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.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

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 Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. 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 will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **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.

Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#). Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

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'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. 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.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

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](#) for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with 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).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is 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.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

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

Formats

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

Regardless of the application used other than Microsoft Office, 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 (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- 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 (or JPEG), EPS (or PDF), 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 online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

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

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

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. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with

either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. 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 and the date when the reference was last accessed. 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.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

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 management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/theriogenology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

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.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they 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. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 2018;19:e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

[4] 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.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13 March 2003].

Reference to a dataset:

[dataset] [6] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

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 [Samples of Formatted References](#)).

Journal Abbreviation 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>

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are

sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

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 µg 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
PGF2 α	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.

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. 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. 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.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from [Frequently Asked Questions](#) to [ways to get in touch](#). You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#)

Apêndice 3 – Normas do periódico Cryobiology

Guide for Authors

Introduction

The Official Journal of the Society for Cryobiology

Types of article

- Regular Papers
- Brief Communications
- Reviews
- Letters to the Editor

Regular papers will describe experimental findings, techniques, or theory. They will consist of an abstract that summarizes the objective of the study, the methods used, and the conclusions reached. Abstracts should not exceed 250 words and should be adequate for direct presentation to abstracting services. After the abstract a list of up to 10 keywords that will be useful for indexing or searching must be included. The Introduction will contain a statement of the purpose of the work, the problem that stimulated it, and a brief summary of relevant published investigations. The Materials and Methods section must be presented in sufficient detail to enable other investigators to repeat the work. The Results should be concise and should avoid redundant tables and figures illustrating the same data. The Discussion should interpret the results, with minimal recapitulation of findings.

Brief Communications are concise reports of original findings, techniques or theory and include an abstract no longer than 150 words and a list of up to 10 keywords. They are not divided into sections. As a guideline it is suggested that there should be no more than 3 tables and/or figures and a maximum of 10 references. The total length, including references, should not exceed 2500 words.

Reviews should only be submitted after first discussing the article with the Editor or a member of the Editorial Board. As with regular papers and brief communications, reviews will be subject to peer review.

Letters to the Editor should concern matters of general interest to the readership of the journal or papers recently published in the journal. Authors of papers that are the subject of comment will be given an opportunity to reply. Letters may not exceed 1 printed page in length and if publication deadlines are pressing, proofs may not be provided. The Editor's decision will be final.

Contact details for submission

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/cryo>.

For questions on the reviewing process or for proposals for Review Articles, please contact the Editor-in-Chief:

Prof. David M. Rawson

E-mail: david.rawson@societyforcryobiology.org

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

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

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
 - All figures (include relevant captions)
 - All tables (including titles, description, footnotes)
 - Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
 - Indicate clearly if color should be used for any figures in print
- Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)
- Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- 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 Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms sex and gender should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under 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, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, 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. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing

Agreement' (see [more information](#) on this). 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. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. 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.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided 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 the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our Open Access page from the Journal Homepage for more information.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submission address

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/cryo>

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review](#).

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. 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. 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. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Manuscripts must be prepared in double or triple line spacing and lines must be numbered. Pages should be numbered in consecutive order.

LaTeX

You are recommended to use the [latest Elsevier article class](#) to prepare your manuscript and [BibTeX](#) to generate your bibliography.

Our [Guidelines](#) has full details.

Subdivision

Regular papers will describe experimental findings, techniques, or theory. They will consist of an abstract that summarizes the objective of the study, the methods used, and the conclusions reached.

Brief Communications should not be divided into sections.

Introduction

The Introduction will contain a statement of the purpose of the work, the problem that stimulated it, and a brief summary of relevant published investigations.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Avoid redundant tables and figures illustrating the same data.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. 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 will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **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.

Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#). Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Abstracts of Regular Papers should not exceed 250 words, abstracts of Brief Communications should not exceed 150 words

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site. Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 10 keywords, using American spelling

and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Use the latest version of the American Chemical Society Style Guide, available at <http://pubs.acs.org/styleguide/>.

The preferred abbreviation for dimethyl sulfoxide is Me₂SO rather than DMSO.

Acknowledgements

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

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Temperatures should be expressed on the Celcius scale. Where relevant, Kelvin units may be used, but the equivalent in degrees Celcius must be added in parentheses

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with 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).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.

- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
 - Number the illustrations according to their sequence in the text.
 - Use a logical naming convention for your artwork files.
 - Provide captions to illustrations separately.
 - Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
 - Submit each illustration as a separate file.
 - Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.
- A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

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

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, 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 (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- 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 (or JPEG), EPS (or PDF), 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 online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

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.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

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. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. 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 and the date when the reference was last accessed. 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.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

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 management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

[http://open.mendeley.com/use-citation-style/Elsevier\(numericwithtitlesortedalphabetically\)](http://open.mendeley.com/use-citation-style/Elsevier(numericwithtitlesortedalphabetically))

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

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: The list of references is arranged alphabetically and then numbered (numbers in square brackets).

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun. 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *Heliyon* 19 (2018) e00205, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000. Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Journal names should be abbreviated according to CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation.

For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 600 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All

instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. 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. 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.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from [Frequently Asked Questions](#) to [ways to get in touch](#). You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#)

VITA

Rômulo Batista Rodrigues, filho de Beatriz Batista e Aliomar Pereira Rodrigues, nasceu no dia 28 de janeiro de 1989 no município de Palmeira das Missões, no estado do Rio Grande do Sul.

Concluiu o ensino fundamental no Instituto Estadual de Educação Borges do Canto em 2003 e o ensino médio no Colégio Estadual Três Mártires em 2006, ambos em Palmeira das Missões-RS. Em 2007 ingressou no curso de Administração, na Universidade Federal de Santa Maria, campus de Palmeira das Missões-RS, cursando até 2008. Em 2008 ingressou no curso de Zootecnia, na Universidade Federal de Santa Maria, no campus de Palmeira das Missões-RS, concluindo sua graduação em Zootecnia em 2014. Durante a graduação, realizou estágio de iniciação científica nas áreas de Avicultura, Bem-Estar e Comportamento Animal e Piscicultura. Ao final do curso de graduação, realizou o Estágio Curricular Obrigatório no Grupo de Estudos de Manejos na Aquicultura (GEMAQ), da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, onde desenvolveu atividades de pesquisa e extensão na área de aquicultura, em: laboratórios, fabricas de ração, pisciculturas e frigoríficos de pescado.

Em 2014 ingressou no mestrado do Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná, sendo Bolsista CAPES. Durante esse período realizou atividades de pesquisa e extensão nas áreas de aquicultura, tecnologia do pescado e nutrição de peixes, no GEMAQ e em parceria com instituições privadas do ramo de Aquicultura e de Nutrição Animal. Em 2016, obteve o título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, na área de concentração em Aquicultura.

Em 2016 ingressou no doutorado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na área de concentração de Produção Animal, sendo bolsista CAPES. Nesse período realizou atividades de pesquisa e ensino no Grupo de Pesquisa AQUAM (Produção e Conservação da Biodiversidade das Espécies Aquáticas), com foco principal no desenvolvimento e aprimoramentos de técnicas relacionadas as metodologias de criopreservação de gametas de peixes, além de trabalhos com reprodução de peixes e avaliação de qualidade de gametas.