

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

O POTENCIAL CRIOPROTETOR DO ALGINATO DE SÓDIO NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO

Itamar Cossina Gomes

Porto Alegre (RS), Brasil

2020

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

O POTENCIAL CRIOPROTETOR DO ALGINATO DE SÓDIO NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO

Itamar Cossina Gomes

Biólogo

Mestre em Zootecnia (UFRGS)

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia como um dos
requisitos para a obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Dezembro de 2020.

ITAMAR COSSINA GOMES

O POTENCIAL CRIOPROTETOR DO ALGINATO DE SÓDIO NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO

Tese apresentada como requisito para
obtenção do Grau de Doutor em Zootecnia,
na Faculdade de Agronomia, da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

Porto Alegre

2020

CIP - Catalogação na Publicação

Gomes, Itamar Cossina
O POTENCIAL CRIOPROTETOR DO ALGINATO DE SÓDIO NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO / Itamar Cossina
Gomes. -- 2020.
109 f.
Orientador: Danilo Pedro Streit Jr..

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

1. Criopreservação. 2. Zebrafish. 3. Alginato de
sódio. 4. Biotecnologia. 5. Reprodução. I. Streit Jr.,
Danilo Pedro, orient. II. Título.

Itamar Cossina Gomes
Mestre em Zootecnia

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: 16.12.2020
Pela Banca Examinadora



DANILO PEDRO STREIT JR.
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientador

Homologado em: 23/07/2021
Por



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



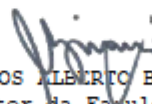
Sheila Nogueira
Universidade Federal da Grande Dourados



Ana Carina Nogueira Vasconcelos
Johns Hopkins University



Patricia Diogo
Necton S.A



CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de Agronomia

Agradecimentos

Agradeço a Deus por todas as coisas, a minha mãe Eguimar Cossina por ser meu pilar e meu norte, por nunca ter me deixado faltar apoio, nem incentivo ao estudo, ao esforço, ao trabalho digno. Ao meu pai Jorge Elias pelo exemplo de vida. À minha irmã Thais Cossina pela força, pelo apoio e pelos inúmeros sacrifícios. Agradeço ao meu orientador Danilo Pedro Streit Jr, por ser orientador, ponderador, amigo, apoiador e por muitas vezes, mesmo nos piores momentos soube apontar a direção certa. Agradeço também à Dr^a Andrea Galuppo, por todo apoio, atenção, carinho e dedicação, além do exemplo profissional. Ao Dr^o Rômulo Rodrigues, que sempre esteve pronto e apto à ajudar. Agradeço também à Dr^a Lis Santos Marques, por todo estímulo, instrução, conhecimento e pelo excelente exemplo profissional. Por último e não menos importante agradeço a todos os membros e ex-membros da equipe AQUAM que participaram dessa jornada, não importando o desafio, sempre estiveram lá apoiando uns aos outros.

O potencial crioprotetor do Alginato de Sódio na criopreservação de tecido ovariano

Autor: Itamar Cossina Gomes

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

Resumo

: A criopreservação de gametas é uma das ferramentas mais promissoras para a preservação de material genético, útil tanto na conservação de espécies ameaçadas de extinção quanto de interesse econômico e agropecuário. Embora a criopreservação de sêmen de peixes já esteja consolidada, são restritos os relativos sucessos na criopreservação de gametas femininos de peixes. Muitos são os problemas acarretados pela não perda de material genético materno tais como, redução na variabilidade genética, perda do material genético mitocondrial e RNAs mensageiros indispensáveis para o desenvolvimento inicial do embrião. Há muitas décadas, pesquisadores tentam encontrar o equilíbrio necessário entre as substâncias utilizadas como crioprotetores e a técnica adequada de resfriamento e aquecimento. No entanto, mesmo com as diversas variações experimentadas, os problemas ainda parecem ser os mesmos: injúrias celulares causadas pela variação de temperatura, estresse osmótico e o alto grau de citotoxicidade dos crioprotetores, além de problemas reportados mais recentemente como a mutagênese, fragmentação de DNA e cromossomos. Alguns criobiologistas e cientistas de áreas afins pesquisam novas alternativas e diferentes conceitos e etapas da criopreservação que vão desde a intensificação das curvas de resfriamento e aquecimento, quanto a busca por novas soluções crioprotetoras que de fato protejam as células. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade crioprotetora do Alginato de Sódio. Trata-se de um polissacarídeo natural extraído de algas marrons, e foi escolhido com agente crioprotetor não permeável por possuir a capacidade de absorver e reter líquidos além de ser uma substância atóxica. Pela primeira vez utilizado na criopreservação de tecido ovariano de peixes, utilizamos o zebrafish como modelo animal. Além disso, avaliamos o potencial comportamento crioprotetor do Alginato de Sódio tanto isoladamente como crioprotetor, quanto em combinações com outros agentes crioprotetores convencionas como o

C₂H₆OS (DMSO), propilenoglicol, metanol e sacarose. E os resultados obtidos com a utilização do Alginato de Sódio foram surpreendentes, dado que houve resultados positivos para a criopreservação de folículos em estágios I e II, além de ocorrências, mesmo que isoladas, de oócitos em elevado grau de maturação, sem alterações morfológicas. Embora haja a necessidade de estudos massivos acerca dessa biomolécula na criobiologia, o conteúdo deste estudo sugere que o uso do Alginato de Sódio pode ser uma escolha saudável de agente crioprotetor não permeável, além de torná-lo objeto de pesquisa na área.

Palavras chave: biotecnologia, conservação, crioprotetor, oócitos, zebrafish.

The cryoprotective potential of sodium alginate in the cryopreservation of ovarian tissue

Author: Itamar Cossina Gomes

Advisor: Danilo Pedro Streit Jr.

Abstract: Gamete cryopreservation is one of the most promising tools for preserving genetic material, useful both for the conservation of endangered species and for economic and agricultural interest. Although the cryopreservation of fish semen is already consolidated, relative successes in the cryopreservation of female fish gametes are restricted. There are many problems caused by the non-loss of maternal genetic material such as, reduction in genetic variability, loss of mitochondrial genetic material and mRNAs indispensable for the initial development of the embryo. For many decades, researchers have tried to find the necessary balance between the substances used as cryoprotectants and the appropriate cooling and heating technique. However, even with several variations experienced, the problems still seem to be the same, cell injuries caused by temperature variation, osmotic stress and the high level of cryoprotectants cytotoxicity, in addition to other problems that new studies discover with each new result, such as example mutagen, fragmentation of DNA and chromosomes. Some cryobiologists and scientists from related fields are researching new alternatives and different concepts and stages of cryopreservation process, ranging from intensifying the cooling and heating curves, to the search for new cryoprotective solutions that actually protect cells. In this context, the aim of this study was to evaluate the cryoprotective capacity of sodium alginate. Because it is one natural polysaccharide extracted from brown algae, and was chosen as a non-permeable cryoprotective agent because it has the ability to absorb and retain liquids in addition to being a non-toxic substance. For the first time used in the cryopreservation in fish ovarian tissue, we used zebrafish as an animal model. In addition, we evaluated the potential cryoprotective behavior of sodium alginate both alone and with cryoprotectant, and in combinations with other conventional cryoprotectants such as C₂H₆OS (DMSO), propylene glycol, methanol and sucrose. And the results obtained with the use of sodium alginate were surprising, given that there were positive results for the cryopreservation of follicles in stages I and II, in

addition to occurrences even if isolated from oocytes in a high degree of maturation, without morphological changes. Although there is a need for massive studies about this biomolecule in cryobiology, the content of this study suggests that the use of sodium alginate may be a healthy choice of non-permeable cryoprotective agent, in addition to making it an object of research in this area.

Key-words: Cryoprotectant, zebrafish, Conservation, Biotechnology, oocytes.

Sumário

1. Introdução.....	13
2. Revisão Bibliográfica.....	16
2.1. Peixes teleósteos	16
2.2. Criobiologia.....	17
2.3. Criopreservação: Visão geral	18
2.3.1. Vitrificação	21
2.3.2. Crioinjúrias.....	26
2.3.3. Criopreservação aplicada a reprodução de peixes.....	30
2.3.4. Criopreservação de gametas femininos de peixes	32
2.4. Agentes Crioprotetores.....	33
2.5. Alginato de Sódio	35
2.6. Zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	39
2.6.1. Reprodução e estrutura ovariana de Zebrafish	40
2.6.2. Oogênese em Zebrafish	41
3. Hipóteses e objetivos.....	45
CAPÍTULO II	46
The effect of equilibrium time in combination of different vitrification solutions for optimization of zebrafish ovarian tissue vitrification protocol.....	48
ABSTRACT	48
INTRODUCTION	49
MATERIALS AND METHODS.....	50
Animals.....	50
Ovarian fragment collection	51
Experimental design.....	51
Equilibrium and vitrification solutions	52
Vitrification procedure	54
Warming.....	54
Membrane integrity evaluation – Trypan blue test	54
Mitochondrial activity assay with modifications.....	55
Statistical analyses.....	55
RESULTS	56
DISCUSSION.....	65
REFERENCES	68
CAPÍTULO III	70

Vitrification of ovarian tissue without internal cryoprotectants: a safer alternative for fish female gametes preservation	71
Abstract	72
Introduction	73
Materials and Methods	74
Animals.....	74
Ovarian fragment collection	75
Experimental design.....	75
Vitrification solutions and protocol	76
Warming.....	77
Membrane integrity evaluation – trypan blue solubilization test.....	77
Membrane integrity evaluation – vitrified tissue.....	78
Mitochondrial activity assay with modifications and pre-test	78
Statistical analyses.....	79
Results	79
Discussion	85
References	89
4. Considerações finais.....	92
Bibliografia	Erro! Indicador não definido.
5. Vita	Erro! Indicador não definido.

Índice de figuras

Figura 1: Filograma adaptado de Advances in Comparative Immunology (2018)	16
Figura 2. Arranjos moleculares dos estados físicos da matéria.	22
Figura 4: Dímero GG. Completar o texto da chamada da figura 4	36
Figura 5: (a) Poly-G (GGGG; (b) Poly-M (MMMM);(c) Molécula de Alginato Poly-GM + Ca ⁺⁺ (AVOGADRO).	38
Figura 6: Fêmea adulta de Zebrafish (Danio rerio).....	39
Figura 7 Estágios de desenvolvimento oocitário de Zebrafish (Danio rerio). Adaptado de (Marques et al., 2015)	41

1. Introdução

Devido a fatores ambientais e antrópicos, nos últimos anos houve um aumento significativo no número de espécies aquáticas ameaçadas de extinção (IUCN RED List, 2017). A criopreservação de gametas de espécies aquáticas é de importância fundamental para preservação do patrimônio genético de diferentes espécies, assim sendo, o desenvolvimento de criobancos permite o armazenamento de genomas específicos por períodos indeterminados. A criopreservação de material gamético de peixes também possui importantes aplicações em biomedicina e aquicultura. No que diz respeito a criopreservação de material genético masculino de peixes (espermatozoides) em inúmeras espécies já houve sucesso na aplicação de protocolos. No entanto, a criopreservação de oócitos e embriões de peixes não foi totalmente alcançada, embora alguns sucessos limitados tenham sido relatados (Godoy et al. 2013, Hagedor et al 1996, Khosla et al 2017).

A criopreservação do genoma materno é importante, pois preserva o DNA mitocondrial e os mRNAs que determinam os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (Tsai et al., 2009). A criopreservação de oócitos imaturos de peixes oferece várias vantagens quando comparados a criopreservação de embriões dos mesmos, em função da ausência de um córion totalmente formado, seu tamanho menor, e por consequência em menor concentração de água além dos índices e variedades de lipídios e organelas de maior complexidade, as quais podem ser lesadas durante o processo de criopreservação (Zhang e Rawson, 1995). Porém, alguns autores em estudos anteriores afirmam que oócitos em estágios mais avançados, e de tamanho maior, possuem menor permeabilidade de membranas se comparado aos estágios iniciais (Isayeva et al., 2004, Zhang et al., 2005), além disso, oócitos em estágio avançado também são mais sensíveis a lesões ocasionadas pelo frio (Tsai et al., 2010). No entanto, essa biotecnologia é utilizada como alternativa viável para a preservação de oócitos ou embriões até mesmo de humanos

(Schmidt et al. 2003) e também se mostrou promissora em diferentes espécies de peixes (Godoy et al., 2013; Marques et al., 2015; Lujic et al., 2017,).

De modo geral, os métodos de criopreservação visam manter as células ou sistemas biológicos em quiescência – permanecendo viáveis por tempo indeterminado – e também objetivam proteger as células dos danos relacionados à formação de gelo intracelular (Lopes et al., 2019). A formação de gelo intracelular também está associada à desidratação excessiva das células, além de mudanças nas concentrações de soluto, que resulta em morte celular (Pegg, 2005). O procedimento de vitrificação é baseado em soluções crioprotetoras altamente concentradas que protegem as células da redução repentina da temperatura, evitando a formação de cristais de gelo através da passagem do estado líquido para o estado amorfo vítreo (Marques et al., 2019). Já o uso de altas concentrações de crioprotetores pode ser tóxico para as células, uma vez que são baseados em álcoois e solventes (Zampolla et al., 2011; Liu et al., 2018). Para mitigar o efeito tóxico dos crioprotetores, tem se proposto adicionar nas soluções crioprotetoras substâncias como açúcares, polímeros ou crioprotetores não permeáveis (Pegg, 2005; Mohanty et al., 2016).

Para minimizar os efeitos negativos relacionados ao processo de criopreservação, se faz necessária a otimização do processo com foco na viabilidade, estabilidade e funcionalidade das células ou tecidos após o aquecimento (Mohanty et al., 2016). Aparentemente, a vitrificação mostrou resultados melhores do que o congelamento lento para a criopreservação de tecido ovariano em Zebrafish (Marques et al., 2019). Apesar dos danos celulares relacionados ao uso de crioprotetores, em 70 anos de uso, apenas mudanças nas combinações e concentrações foram estudadas. Considerando isso, decidimos aprimorar o protocolo de vitrificação para preservação do tecido ovariano de peixes.

Acreditamos que, se bem controlado, o procedimento de vitrificação em si será capaz de preservar a viabilidade celular. Para corroborar essa ideia, decidimos testar se era possível criopreservar células sem o uso de crioprotetores internos, como metanol ou dimetilsulfóxido (DMSO), e identificamos o Alginato de Sódio como uma substância atóxica com

características para esse fim. O Alginato de Sódio é um polissacarídeo natural extraído de algas marrons com propriedades físico-químicas únicas, como sua capacidade de formação de gel tridimensional, alta viscosidade em solução aquosa, rápida absorção de água e também pode aumentar a resistência celular ao inchaço osmótico (Liu et al., 2018). O Alginato de Sódio já foi utilizado com sucesso para preservação de células somáticas e células-tronco, apresentando alta viabilidade, integridade de membrana e atividade metabólica das células promovendo um ambiente otimizado e menos citotóxico (Gryshkov et al., 2015; Liu et al., 2018). Portanto, o foco do estudo foi desenvolver um protocolo de vitrificação de tecido ovariano de peixes sem o uso de crioprotetores internos como alternativa mais saudável para a preservação dos gametas femininos.

Neste contexto, com o intuito de desenvolver novas metodologias para obter o sucesso na criopreservação do gameta feminino de peixes, utilizamos o Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo animal, dado ao seu tamanho pequeno, rápido ciclo reprodutivo, baixo custo de produção, além das vantagens anatômicas e fisiológicas. Nesses animais, as fêmeas adultas possuem ovários assíncronos, contendo folículos em todos os estágios de desenvolvimento (Clelland et al. 2007). Ao contrário dos oócitos de mamíferos, os oócitos do peixe-zebra são relativamente grandes. O ovário de um Zebrafish é composto por um epitélio fino e cada folículo contém um oócito rodeado e uma camada interna de células da granulosa e uma camada externa denominada teca (Wallace et al. 1981).

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Peixes teleósteos

Os Peixes ósseos ou cientificamente classificados como Osteichthyes, compõem o mais diverso grupo de peixes atualmente, além de ser a superclasse com o maior número de espécies dentre os vertebrados. O grupo recebe essa classificação em função de tecido esquelético ser composto basicamente de tecido ósseo. Além disso, esta superclasse é dividida em Sarcopterygii e Actinopterygii a qual pertencem os teleósteos (teleostei) (Figura 1). De acordo com os registros fósseis acredita-se ter surgido durante o período Triássico e é

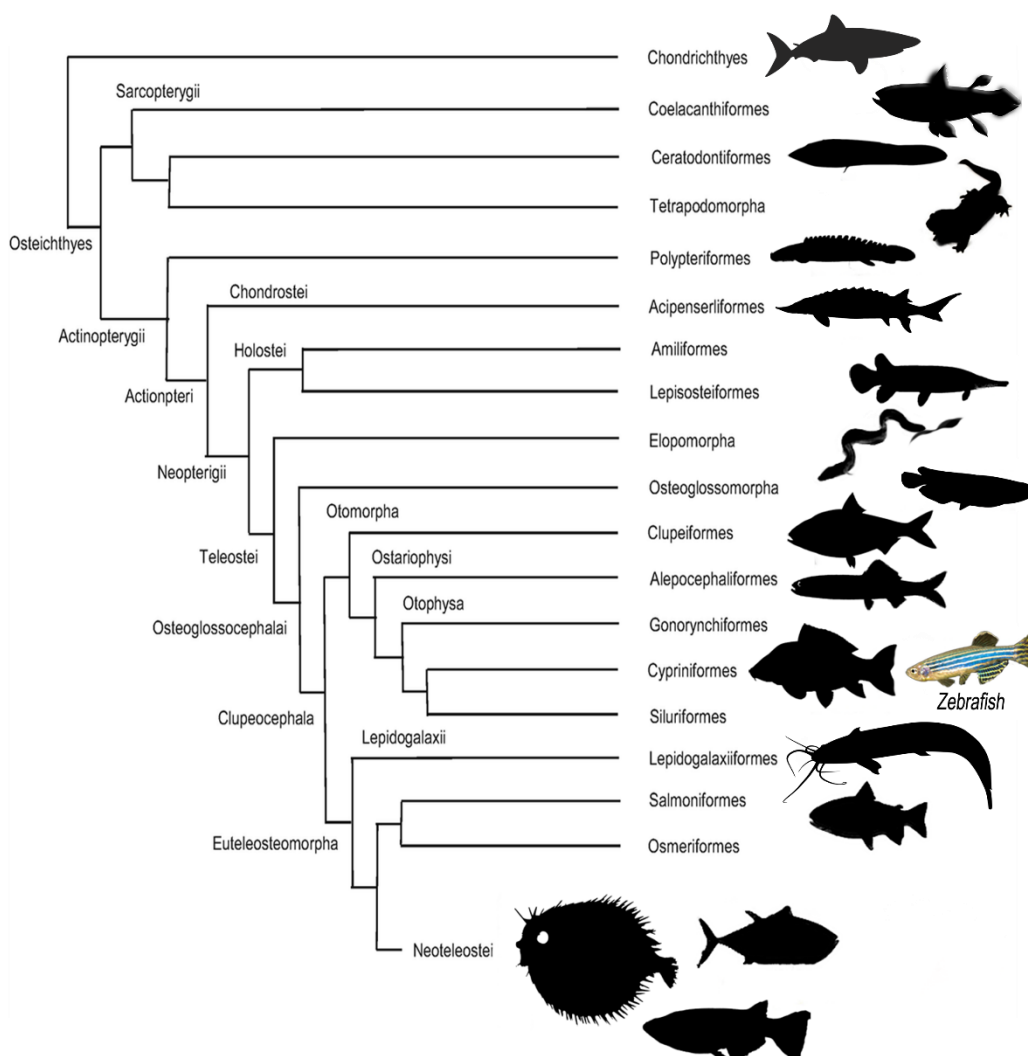


Figura *Erro! Nenhum texto com o estilo especificado foi encontrado no documento.*-1: Filograma adaptado de Advances in Comparative Immunology (2018)

representada por 96% de todas as espécies conhecidas de peixes atualmente,

sendo subdividida em aproximadamente 63 ordens, 469 famílias e mais de 29.000 espécies descritas (Nelson et al., 2016)

O fato de os teleósteos representarem a grande maioria das espécies de peixes, e dentre elas situam-se todas as espécies de produção, sejam ornamentais e de corte, de interesse econômico, científico ou para conservação ambiental coloca esse grupo numa posição singular de destaque para pesquisas científicas, onde determinadas espécies podem ser estudadas para a de fármacos, alimentos, biotecnologias ou até mesmo em função do alto grau de similaridade genética, algumas espécies podem ser utilizadas como modelos experimentais para estudos genéticos e fisiológicos com foco em terapia para humanos, como por exemplo o Zebrafish.

2.2. Criobiologia

A Criobiologia (do grego kryos = frio, bios = vida, e logos = ciência) basicamente consiste no estudo da vida em baixas temperaturas e como esta influencia os diferentes sistemas biológicos. Trata-se de um braço da ciência essencialmente interdisciplinar, o qual visa estudar quaisquer materiais biológicos submetidos à temperaturas sub-fisiológicas. Neste contexto essa ciência demanda conhecimentos oriundos de áreas diversas tais como: biologia, física, química, biofísica, bioquímica, físico-química, fisiologia, termodinâmica e afins, para assim tentar compreender os efeitos do resfriamento e aquecimento sobre o material biológico.

Já no século XVII Robbert Boyle, Jhon Hunter e Spallanzani trilhavam os caminhos que originariam a criobiologia, e em 1940 Luyet e Gehenio em “Life and Death at Low Temperatures”, relataram que congelaram uma grande variedade de tecidos e organismos. Os naturalistas ao constatar a morte de muitas células após o seu congelamento, e perceberem que as mortes foram em função da formação de cristais de gelo, sugeriram que poderiam evitar a formação do mesmo caso as resfriassem rapidamente. Este fato que ficou comprovado após constatar a sobrevivência de células em amostras que foram submetidas a um curva de resfriamento mais intenso. Em 1949, Polge, Smith e Parkers relataram

uma alta taxa de sobrevivência e amostras de sêmen de galo, o qual havia sido congelado com a adição de glicerol, dando assim um novo rumo a criobiologia. Essa descoberta conduziu imediatamente a validação das aplicações práticas dessa técnica (criopreservação de gametas), e possibilitou mais estudos fundamentais sobre os mecanismos das lesões causadas pelo processo de criopreservação e como evita-las.

Os consecutivos avanços na criobiologia possibilitaram a compreensão de diversos fenômenos biológicos, físicos e químicos que ocorrem em sistemas biológicos quando abaixo de 0°C. Permitindo criar estratégias para mitigar fenômenos nocivos aos sistemas biológicos ou manipula-los. Dessa forma, pode-se evitar o comprometimento do material resfriado, que é normalmente mantido em gelo seco (-80°C), vapor de NL (-130°C) ou mais amplamente utilizados imersos em NL a (-196°C). Essas baixas temperaturas praticamente impossibilitam movimento molecular (Grout, et al., 1990). Portanto, a criopreservação consiste no processo de estocar e manter sistemas biológicos vivos em estado de quiescência, dessa forma, “parando no tempo” as reações químicas relacionadas ao metabolismo celular, impedindo o envelhecimento e morte das células criopreservadas (Mazur, et al., 1984).

Evidentemente o processo de criopreservação é extremamente agressivo, pois os riscos à integridade dos sistemas biológicos são oriundos desde a própria curva de resfriamento e aquecimento, até as interações físicas e químicas com os crioprotetores. Portanto desvendar o equilíbrio adequado em relação aos crioprotetores utilizados e a curva de resfriamento adequada unidos num protocolo específico definem o fator chave na obtenção do sucesso na criopreservação de sistemas biológicos.

2.3. Criopreservação: Visão geral

Na essência, existem basicamente duas formas de criopreservação, sendo elas o congelamento lento controlado e a vitrificação. O congelamento lento controlado foi a primeira técnica de criopreservação a ser desenvolvida e consolidada (Whittingham, 1971; Whittingham et al., 1972; Wilmut, 1972, Willadsen et al., 1976, 1978). Essa técnica consiste em aplicar as amostras

biológicas a uma curva específica de resfriamento pré-estabelecida, e essa só pode ser possível a partir do desenvolvimento de resfriadores programáveis controlados por algum tipo de software, o qual controla o congelamento de forma sistemática e padronizada. O resfriamento da câmara de criopreservação se dá pelo bombeamento de vapor de nitrogênio líquido (NL) para dentro da respectiva câmara. Nessa técnica, quanto ao resfriamento os tópicos requisitos essenciais a serem definidos e cumpridos para a obtenção do sucesso na criopreservação são: a) taxa de resfriamento; b) temperatura de “seeding”; c) temperatura em que as amostras são mergulhadas em NL; d) taxa de aquecimento (descongelamento) e por fim e) eficácia na remoção dos crioprotetores. Nessa técnica, a curva de congelamento lento controlado ideal é dependente do volume e composição da amostra. Portanto, definido pela seguinte condição: o resfriamento deve ser lento o suficiente para que atinja o grau de desidratação celular específico necessário durante o congelamento (evitando a formação de cristais de gelo), sem ser lento o bastante para que haja a superexposição as soluções crioprotetoras e salinas (evitando o efeito citotóxico das mesmas).

Durante o congelamento, a formação de gelo é praticamente inevitável, e em algum momento a nucleação ocorrerá, e haverá a formação de gelo intracelular, o qual aumentará drasticamente e isso por sua vez pode causar lesões severas ao material biológico criopreservado (Toner et al., 1993). Neste contexto, o “seeding” que consiste na indução intencional do crescimento controlado de gelo no meio extracelular, resulta na elevação da concentração de íons, macromoléculas, e crioprotetores na solução restante (Mazur, 1990; Vajta & Nagy, 2006). A técnica é executada introduzindo ao meio de criopreservação uma ferramenta metálica previamente resfriada em NL. Essa técnica induz a desidratação celular e entrada dos crioprotetores nas células sem que haja sérios riscos de alterações morfológicas em função do gradiente osmótico, e como esse processo é efetuado em temperaturas a baixo de zero, o efeito citotóxico dos crioprotetores que estão permeado as membras é mitigado.

Após atingir a temperatura programada para o congelamento lento as amostras são mergulhadas em NL, onde permanece na temperatura de estocagem de longo prazo. O índice de resfriamento ao serem introduzidas no NL atinge de menos 200 a 300 °C/min até estabilizarem em -196°C.

Normalmente a temperatura de mergulho situa-se entre -20 a -40°C , onde praticamente toda água intra e extracelular encontra-se em fase sólida, exceto uma pequena porção ligada à membranas, a qual solidifica-se totalmente por volta dos -150°C .

A vitrificação foi introduzida por Rall & Fahy (1985) como uma técnica de criopreservação “livre de gelo”, utilizando um embrião de camundongo. Essa técnica é caracterizada pela intensa curva de resfriamento, onde a água passa do estado líquido para o sólido de forma tão rápida que não há tempo para a formação de cristais de gelo, e o estado físico alcançado pela mesma é um estado sólido denominado de vítreo amorfo, no qual não há tempo das moléculas se organizarem durante a solidificação. E em criopreservação esse estado é obtido através da elevação da viscosidade da solução crioprotetora utilizando-se de altas concentrações de CPAs (crioprotetores). Embora o conceito de vitrificação preceda o trabalho de Rall & Fahy, pois Luyet (1937) já havia proposto que o resfriamento ultra rápido de pequenos sistemas biológicos poderia eliminar a formação de gelo, os índices de resfriamento necessário jamais seriam atingidos com a tecnologia daquela época. No entanto água não apresenta um alto grau viscosidade e para que haja sua vitrificação propôs-se a elevação da viscosidade dos soluções de criopreservação através de adição de crioprotetores que a garantissem essa propriedade às soluções, os quais reduziram a temperatura de congelamento das amostras, assim sendo quando essa solução fosse rapidamente resfriada, atingiria um estado vítrio amorfo rapidamente e a amostra ficaria livre de gelo (Fahy, 1986).

Para ambas as técnicas, vitrificação e congelamento lento controlado, o aquecimento e a eficácia na remoção dos crioprotetores tem se mostrado o momento crítico, em especial o aquecimento. O Descongelamento para a técnica de congelamento lento controlado é geralmente realizado em um congelador programável, em alguns casos apenas expondo a amostra à temperatura ambiente. No caso do descongelamento rápido é realizado o mergulho da amostra em banho-maria com temperatura controlada geralmente próxima à temperatura fisiológica da amostra em questão. De forma mais abrangente os criobiologistas consideram o descongelamento rápido mais vantajoso, dado que não fornecem a condição para que haja recristalização e a formação de grandes

cristais de gelo, além de reduzir o tempo de exposição das amostras às soluções crioprotetores em altas concentrações (Gordienko & Pushkar, 1994).

Quanto ao resfriamento na técnica de vitrificação, este deve ser tão intenso quanto o seu resfriamento dado que as concentrações de CPAs são relativamente mais elevadas se comparadas as utilizadas no congelamento lento controlado, e esse fator torna o tempo de exposição da amostra aos CPAs ainda mais crítica.

Para diferenciar a nomenclatura utilizada para cada técnica de criopreservação, deve-se levar em consideração alguns fatores. Quanto ao congelamento lento controlado, a água extracelular cristaliza, e o processo de cristalização no meio extracelular promove um gradiente osmótico de dentro para fora da célula de forma lenta e controlada, até que finalmente ocorra a vitrificação. Já na técnica de vitrificação, tanto a água intracelular quanto extracelular, vitrificam após a desidratação da célula e todas as etapas ocorrem de forma extremamente rápida se comparada a outra técnica. Essa diferença entre a ordem dos fatores determina a nomenclatura utilizada para os processos de ambos, onde para o resfriamento lento controlado utiliza-se (congelamento e descongelamento) e para vitrificação (resfriamento e aquecimento).

2.3.1. Vitrificação

Do grego *vitri* = vidro uma nomenclatura física utilizada para classificar estados sólidos especiais. De modo geral a matéria existe em condições naturais em três estados físicos: sólido, líquido e gasoso. Porém, o estado vítreo ou amorfo consiste da combinação estrutural ordenada de sólidos cristalinos em fusão, com a estrutura desordenada, característica dos líquidos (Wowk, 2010). Um "líquido sólido" ou "cristal líquido" é chamado de vidro, e a conformação atômica no estado vítreo, embora apresente um arranjo desordenado, permanecem numa posição fixa (Figura 2). Obtém-se esse estado ao se resfriar rapidamente uma solução em fusão, ao tornar-se rígida, sem a formação de estruturas cristalinas. Assim, para que ocorra vitrificação é necessário que haja um arrefecimento intensamente rápido, o que impede a reorganização estrutural química e fisicamente, conferida a cada substância de acordo com seu arranjo

atômico ou molecular materiais, requerida pela cristalização (Zarzycki et al., 1991). A vitrificação também pode ser definida como o processo de solidificação com arranjo desordenado de um líquido, ou seja, sem a formação de cristais, mas também como o aumento extremo na viscosidade das soluções a baixas temperaturas. (Taylor- Robinson, et al. 2014).

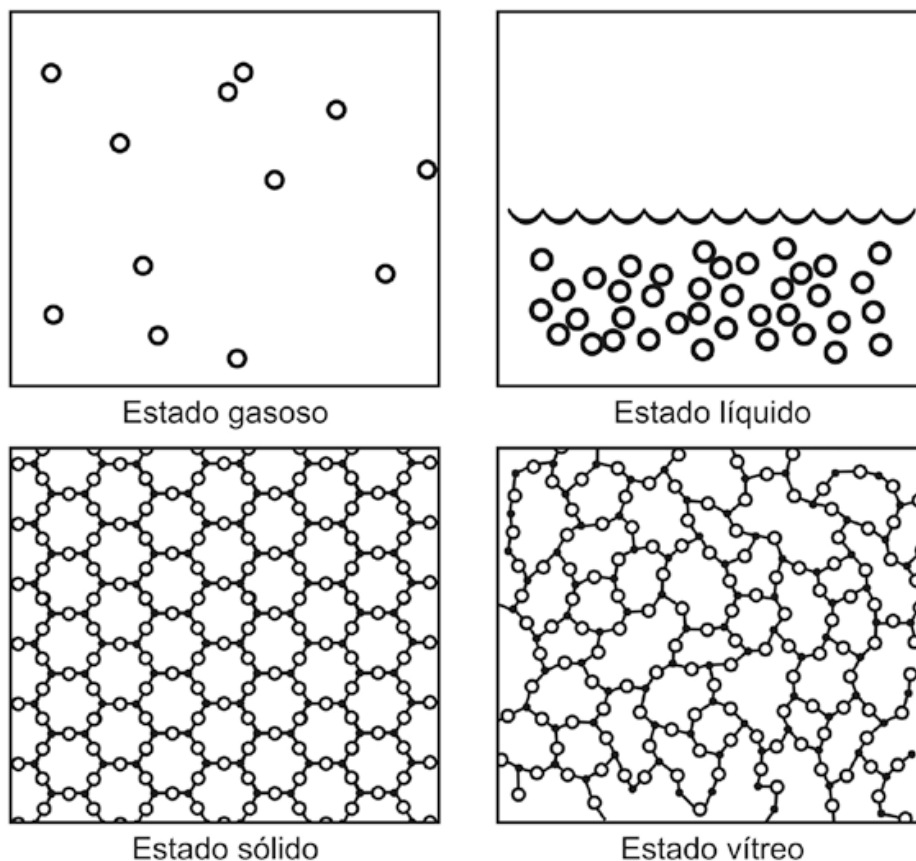


Figura Erro! Nenhum texto com o estilo especificado foi encontrado no documento.-2. Arranjos moleculares dos estados físicos da matéria.

Na execução da técnica de vitrificação aplicada em sistemas biológicos, amostras destes ficam em suspensão em uma solução de vitrificação (solução crioprotetora) por um determinado período. Após a remoção do excesso de solução crioprotetora da amostra, em seguida mergulha-se em NL ou vapor de NL, com o menor volume possível, seja diretamente através de um dispositivo de criopreservação aberto, semi-aberto ou fechado.

A primeira fase do processo de Vitrificação é a exposição das amostras às soluções de equilíbrio (SE). As SE são compostas pela mesma formulação das soluções vitrificantes (SV) no entanto, as SE detêm menor concentração de

agentes crioprotetores se comparadas as SV. O período de exposição as SE é chamado de tempo de equilíbrio (TE), e esse processo de equilíbrio tem como objetivo tanto induzir o início do processo de desidratação celular, quanto reduzir o estresse osmótico induzido pelas altas concentrações de CPA nas SV. Além disso, o TE pode variar de acordo com o protocolo e material biológico utilizado. Essa etapa é indispensável, pois em determinadas condições as células podem ser acometidas pela toxicidade do crioprotetor mesmo dele adentrar a membrana celular e ocupar o interior da célula. Com o intuito de evitar a formação de gelo intracelular, longas exposições aos agentes crioprotetores são comumente realizadas, porém, exposições prolongadas intensificam os índices de lesões tóxicas provocadas pelos crioprotetores. Nesse sentido é necessário conhecer e compreender os agentes crioprotetores utilizados nas SV para assim utilizar concentrações e tempos de exposição equilibrados. Após o tempo de equilíbrio as amostras são submetidas as soluções de vitrificação por um período de tempo menor ao TE que varia de 30-60 segundos, então são mergulhadas em nitrogênio líquido. Sabe-se que o tempo de exposição ótima para a solução de vitrificação, depende diretamente do agente crioprotetor utilizado e a temperatura. As curvas de resfriamento e aquecimento influenciam tanto na permeabilidade a membrana celular, quanto na toxicidade dos agentes crioprotetores (Menezo, et al., 1992; Mukaida, et al., 2012; Rall, et al., 1985).

No intuito de compreender o efeito de diferentes taxas de resfriamento e aquecimento Mazur et al. (2011) submeteram oócitos de ratos a quatro taxas de resfriamento indo de 95 a 69.250 °C/min até atingir -196 °C, e cinco taxas de aquecimento variando de 610 a 118.000 °C/min até superar 0°C. Os autores constataram neste estudo que independentemente da taxa de resfriamento, a taxa de aquecimento mais alta, resultava numa maior taxa de sobrevivência. No entanto, em amostras aquecidas à taxa mais baixa (610°C/min), os índices de sobrevivência foram baixos independentemente da velocidade de resfriamento prévio, apresentando redução inversamente proporcional indo 25% para 0% de sobrevivência conforme a taxa de resfriamento aumentava de 95 a 69.000 C°/min. É possível sugerir que em taxas de aquecimento mais baixas, além da exposição prolongada aos crioprotetores, podendo ter havido a formação de cristais de gelo, o que explicaria a redução nos índices de sobrevivência

conforme a curva de aquecimento torna-se menos intensa. Quanto mais estudos específicos são realizados, mais evidente parece ser a relação entre as velocidades de resfriamento e principalmente aquecimento com a sobrevivência das células criopreservadas. E nesse contexto vale mencionar outro estudo onde os pesquisadores utilizaram pulsos de laser para aquecer amostras oócitos de ratos vitrificados, e o estudo registra taxas de sobrevivência superiores a 80% após o aquecimento. (Bo-Jin, et al., 2014).

O aumento da concentração dos agentes crioprotetores e o aumento das taxas de resfriamento são fatores considerados indispensáveis as técnicas de vitrificação, pois a alta concentração de crioprotetores e o resfriamento rápido facilitam a vitrificação da amostra. Porém, pode-se notar que há uma correlação inversamente proporcional entre os dois fatores, dado que quanto maior a intensidade das curvas de arrefecimento e aquecimento, menor será a necessidade de crioprotetores em altas concentrações e vice-versa. A água pura, por exemplo, pode ser vitrificada com uma taxa de resfriamento extremamente rápida, no entanto, é uma condição difícil de ser obtida em laboratórios pouco especializado (Rall, et al., 1987). Em contrapartida, ao elevar as concentrações dos agentes crioprotetores, essas soluções podem ser vitrificadas com curvas moderadas de arrefecimento. Para a criobiologia aplicada a reprodução, essa ferramenta ainda não pode ser utilizada de forma 100% eficiente à todas as espécies, pois os agentes crioprotetores utilizados e conhecidos apresentam índices de citotoxicidade nas condições em que são aplicados. O que valida a busca por novos protocolos de vitrificação para reprodução assistida, e os esforços nessa busca devem concentrar-se no desenvolvimento de métodos práticos e seguros de alcançar a condição ótima de resfriamento e aquecimento, além da combinação ideal de crioprotetores que em menor concentração, possam garantir o estado de vitrificação de forma segura para as células tanto intra quanto extracelular, seja no resfriamento ou no aquecimento (Vajta, et al., 2009).

De forma geral, grande parte dos criobiologistas defendem que há a necessidade de utilizar agentes crioprotetores que aumentem a viscosidade da solução crioprotetora. Essa ideia pode ter surgido do conceito geral da condição de formação do estado vítreo, o qual requerer a elevação instantânea

do grau de viscosidade de um meio, ao ponto de tornar-se sólido. Em temperaturas ambientes, não existe uma correlação clara ou direta entre a viscosidade do crioprotetor e sua eficácia no processo de vitrificação (Vajta et al., 2009). Etilenoglicol ou propilenoglicol, por exemplo, não são totalmente viscosos, e também não causam aumento dramático na viscosidade da água, mesmo sendo considerados exemplos de agentes crioprotetores eficientes e dois dos mais amplamente utilizados em vitrificação. Por outro lado, o glicerol é altamente viscoso, e amplamente utilizado no congelamento tradicional, e tem sido utilizado como agente crioprotetor em vitrificação (Vajta et al., 2009).

A ocorrência do fenômeno de vitrificação pode ser facilmente visualizado a olho nu ou com auxílio de um estereomicroscópio, pois a solução criopreservada pode ser nitidamente observada de forma transparente e sem quaisquer traços de manchas brancas as quais denotam a formação de gelo. Muito embora a observação visual seja prática e fácil, não pode ser aplicada em algumas situações. Por exemplo, a maneira mais fácil de se atingir altas velocidades de resfriamento é reduzindo ao máximo o volume de solução crioprotetora que envolve a amostra, e mergulhando-a diretamente em nitrogênio líquido. Alguns procedimentos de vitrificação, são eficientes apenas em uma pequena camada ou película de solução, e outros não é possível a avaliação óptica do estado de vitrificação da amostra, como por exemplo em sistemas completamente fechados (Vajta, et al., 2009).

Sem dúvidas, uma das maiores vantagens da técnica de vitrificação é o fato de ser relativamente econômica, pois dispensa a necessidade de equipamentos sofisticados e caros, além de poder ser executada em qualquer ambiente apenas mergulhando a amostra em nitrogênio líquido contido em uma caixa de isopor por exemplo (Vajta, et al., 2010). Além disso o tempo de execução de trabalhos com vitrificação é bastante diminuto se comparado ao congelamento lento controlado de alguns minutos para em média 3 horas respectivamente (Al-Azawi, et al., 2013). Além disso, o processo de vitrificação aparentemente causa menos crioinjúrias ao citoesqueleto e nas membranas celulares devido às altas taxas de resfriamento obtidas por essa técnica (Sharma, et al. 2010). E for fim, a intensa curva de resfriamento e aquecimento

também parece evitar lesões nas porções lipídicas e do citoesqueleto, pois passam rapidamente pelas zonas térmicas críticas (Arav, 2014).

Embora haja algumas desvantagens relacionadas à vitrificação, como o estresse osmótico e a toxicidade causada pela solução crioprotetora (Lee, et al., 2010), a vitrificação torna-se cada vez mais utilizada para preservar tecidos de mamíferos, como: humanos (Zhou, et al., 2010); caprinos (Carvalho, et al., 2013); murinos (Fathi, et al., 2013). A partir da preservação do material genético alvo, o mesmo pode ser utilizado na reprodução assistida, mostrando resultados promissores em: humanos (Amorim, et al., 2012; Isachenko, et al, 2006; 2009; Keros, et al, 2009; Sheikhi, et al, 2011; Sheikhi, et al, 2013; Talevi, et al., 2016); bovinos (Kagawa, et al., 2009) e recentemente em peixes (Lujic et al., 2017; Marques et al., 2015, 2018, 2019).

O fato de a vitrificação causar relativamente menos lesões às estruturas celulares pode ser constatado em trabalhos como os de Salehnia et al., (2012) e Sheikhi et al., (2013) que relataram que a vitrificação não aumenta a incidência de apoptose das células do estroma ou dos folículos primordiais ou primários em tecido ovariano humano. Além disso, Dominguez et al. (2013) não constataram distúrbios no metabolismo de embriões desenvolvidos a partir de oócitos vitrificados.

A adição de novas substâncias não tóxicas as soluções de criopreservação tem chamado a atenção da comunidade acadêmica, onde por exemplo a adição de proteínas anti-congelantes resultou numa alta taxa de sobrevivência (Yan-Wen et al., 2014). A adição de alginato extraído de algas marinhas no encapsulamento de folículos pré-antrais de bovinhos resultou em mais de 87% de folículos com sua morfologia preservada (Bus et al., 2018). Quanto a preservação do material genético ao criopreservar oócitos murinos os autores relataram que a técnica não provocou danos cromossômicos, e os folículos ao serem cultivados, desempenharam um desenvolvimento fetal que se assemelhou a àqueles obtidos de fertilização in vitro (Bos-Mikich, et al. 1995).

2.3.2. Crioinjúrias

As lesões que as baixas temperaturas podem ocasionar às células tanto durante um resfriamento lento quanto ao serem submetidas a quedas bruscas

de temperatura (choque frio) (Belous & Grishenko, 1994) podem ser diferentes. O resfriamento influi nos processos enzimáticos e não enzimáticos no interior das células, alterando o equilíbrio homeostático, e conseqüentemente, poderá provocar estresse oxidativo e peroxidação de lipídios resultando em apoptose, por exemplo. Por outro lado, o choque frio ocasionado por taxas de resfriamento mais rápido pode resultar em lesões nos sistemas de membranas, além de intensificar o gradiente osmótico pela perda de K^+ tornando-as mais permeáveis.

Uma das crioinjúrias mais recorrentes, está relacionada a alteração da estrutura da membrana plasmática, seja na fluidez, morfologia ou até sua ruptura. A fluidez da membrana está diretamente relacionada aos níveis de colesterol, da composição dos fosfolipídios, do grau de insaturação e da concentração de proteínas, as quais podem ser utilizadas como indicadores de fluidez. A causa das crioinjúrias que afetam a estrutura da membrana plasmática, com frequência esta intimamente relacionada a formação de gelo. Este fenômeno pode ser formado através da membrana plasmática após uma lesão, oriunda de um gradiente osmótico, conseqüente do efluxo de água gerado pelo gradiente de temperatura ou mesmo romper a membrana através do processo de nucleação e formação de cristais (Giraund, et al., 2000).

A característica hidrofóbica dos lipídios influencia diretamente no comportamento bio/físico/químico do metabolismo e estrutura celular, inclusive na tolerância ao estresse térmico (Zeron, et al., 2002; Arav & Zvi, 2008). Os lipídios que se apresentam na membrana celular e que também podem estar na forma de gotículas intracitoplasmáticas, tem se mostrado como fator limitante no sucesso da criopreservação. Deste modo, quanto maior o teor de lipídios, mais susceptível e vulnerável torna-se esse sistema à fenômenos de oxidação lipídica e liberação de espécies reativas de oxigênio, e esses fatores juntos tornam-se uma grande cascata de problemas quando a temperatura começa a baixar e principalmente quando volta a subir. Esse entrave relacionado a quantidade de lipídios, embora varie de espécie para espécie, foi relatado principalmente em suínos (Dobrinsky, 2001), felinos (Luvoni, 2006; Galiguis, et al., 2014) e peixes (Isayeva, et al., 2004), e esses grupos são considerados justamente os quais se concentram os maiores desafios quando se trata de criopreservação de material gamético materno.

As curvas de resfriamento e aquecimento podem comprometer as propriedades físico-químicas dos lipídios de membrana e intracitoplasmáticos, e essas alterações irão refletir em todas as estruturas celulares as quais os lipídios estiverem associados, podendo causar deformação celular, ruptura e consequente colapso do citoesqueleto (Bodin, et al., 2005; Isachenko, et al., 2001; Okada, et al., 2014). O citoesqueleto é responsável pelas funções cinéticas no interior da células, seu colapso pode acarretar numa progressão anormal da divisão meiótica, anomalias cromossômicas, citocinese anômala, e todos os problemas funcionais decorrentes dessas alterações, caso a célula se desenvolva, pode provocar o retardo no desenvolvimento embrionário ou até mesmo sua inibição (Eroglu, et al., 1998; Hyttel, et al., 2000; Rojas, et al., 2004; Succu, et al., 2007; Wong, et al., 2014). A preservação dos componentes do citoesqueleto é de extrema importância, em especial do fuso mitótico em células que se encontram em metáfase II. Nessa fase os cromossomos encontram-se alinhados formando a placa equatorial e os microtúbulos ligados aos centrômeros estão estendidos, o que torna sua preservação, durante os processos envolvidos na criopreservação um grande desafio. O fato de estarem estendidos de forma a atravessar a célula em fusos, os microtúbulos estão sujeitos a quaisquer lesões passíveis de ocorrer durante o processo (colocar qual processo). Esse contexto também poderia explicar os relatos sobre a presença menos acentuada de crioinjúrias em oócitos primários (imaturos) dado que estes não encontram-se em prófase (Rojas, et al., 2004) e isso também pode estar associado aos índices de sucesso obtidos na criopreservação de folículos imaturos de peixes (coloca aqui o trabalho da Lis ou da Laura que chegou a esta conclusão). No entanto lesões no fuso meiótico já foram relatados após a vitrificação de oócitos de bovinos (Hyttel, et al., 2000), suínos (Rojas, et al., 2004), ovinos (Succu, et al., 2007), murinos (Gomes, et al., 2008) e humanos (Martínez-Burgos, et al., 2011).

O acometimento da viabilidade celular causado pela desorganização e extravasamento da membrana também está relacionado as transições na fase lipídica (Lattman, et al., 1994). De acordo com Tajima & Shimizu, 1973, as proteínas submetidas ao resfriamento sofrem desnaturação, dado que as moléculas de água e pontes de hidrogênio adquirem estruturas mais ordenadas

em baixas temperaturas. Essa exposição também pode alterar as ligações hidrofóbicas entre as cadeias proteicas laterais resultando em interações fracas, e esses fatores induzem a desnaturação das proteínas. De forma geral, células submetidas à fatores não naturais como poluentes, toxinas ou temperaturas não fisiológicas, por exemplo, estão sujeitas ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, que pode resultar em estresse oxidativo, danificando elementos importantes para as células como organelas, lipídios, proteínas, podendo também causar fragmentação do DNA, disfunção mitocondrial e consequentemente apoptose celular (McKersie, et al., 1990; Tsang, et al., 1991; Scandalios, 1993; Wood & Youle, 1995; Prasad, 1996; Guerin, et al., 2001; Lister, et al., 2010a, b; Riesco, et al., 2012). Embora a maioria dos estudos avaliando os efeitos das espécies reativas de oxigênio seja referente a gametas masculinos (Gürler, et al., 2016), o uso de antioxidantes pode reduzir os efeitos do estresse oxidativo na criopreservação (Gale, et al., 2014), porém não evita os efeitos adversos ocasionados por essa biotecnologia.

As células submetidas a criopreservação estão sujeitas aos efeitos modulados por quaisquer elementos físicos ou químicos adicionais utilizados no processo de criopreservação. O uso de crioprotetores submete as células à uma série de efeitos específicos e inespecíficos, intracelulares e extracelulares. A exemplo de efeitos químicos, temos: redistribuição nos compostos iônicos, mudança de pH, ação de radicais livres, transição de fase de biopolímeros, além efeitos citotóxicos e oxidativos. Como eventos físicos de possível ocorrência pode-se citar alterações da pressão osmótica com consequente desidratação, lesões morfológicas ocasionadas pela formação cristais de gelo e alterações causadas pelo aumento da pressão hidrostática devido a mudança da concentração relativa de solutos no interior da célula (Kopeika, et al., 2005; Sharma, et al., 2010; Riesco, et al., 2012).

O processo de criopreservação também pode alterar o material genético, embora pareça não haver consenso quanto a frequência e intensidade das lesões, indicando que as respectivas alterações podem estar intimamente relacionadas a natureza do material criopreservado e o protocolo de criopreservação utilizado. No estudo de Fatehi et al. (2014) foi relatado não haver alterações significativas na expressão gênica entre as culturas obtidas de

folículos murinos frescos e criopreservados, no entanto, a taxa de sobrevivência para os grupos criopreservados foi relativamente menor após a incubação. Em outro estudo comparando vitrificação e congelamento lento por [Wong et al. \(2015\)](#) os autores afirmaram, que ambos conservaram as características morfológica celular, embora a vitrificação tenha sido mais eficiente na proteção da integridade do material genético.

A criopreservação também pode afetar a morfologia e o funcionamento mitocondrial que são extremamente sensíveis ao frio (Tsvetkov & Naydenova, 1987), como foi observado por Rauen (1999) superpermeabilização e inchaço mitocondrial ao apenas resfriar células animais e vegetais. Além disso as cristas mitocondriais são facilmente acometidas pela formação de cristais de gelo (Mazoochi et al., 2008; Bonetti, et al., 2011), o que por sua vez pode prejudicar severamente a atividade metabólica das células (Shahedi et al., 2013). Esse tipo de injúria, na criopreservação de embriões por exemplo, pode inviabilizá-la por completo, dado que os altos índices de ATP exigidos para o desenvolvimento embrionário não podem ser comprometidos (Van Blerkom, 2011). Além de danos cromossômicos e ao DNA genômico, foi constatado em embriões de zebrafish e em células tronco embrionárias humanas um aumento do nível de mutação no DNA mitocondrial após a criopreservação (Kopeika, et al., 2005). A criopreservação do DNA mitocondrial é de extrema importância, dado que além de conservar funções metabólicas, também mantém parte da herança materna. E foi relatado por Bonetti et al. (2011) na criopreservação de material genético materno humano, matrizes mitocodriais elétrons-densas e cristas bem preservadas, indicando que as condições proporcionadas pela metodologia empregada preservou a integridade das mitocôndrias. Porém, em um estudo pioneiro com peixes, ao trabalhar com tecido ovariano de zebrafish Godoy et al. (2013), relataram a degeneração da função mitocondrial em folículos ovarianos de Zebrafish em estágio III, e ressaltaram a necessidade de compreender a complexidade do tecido ovariano de peixes em baixas temperaturas e que demasiados estudos ainda são necessários.

2.3.3. Criopreservação aplicada a reprodução de peixes

Há décadas tem estado em destaque biotecnologias voltadas a reprodução assistida, seja em animais ou humanos. Nesse contexto a

criobiologia ocupa uma posição de destaque no que diz respeito a manutenção da biodiversidade genética, seja para programas de melhoramento animal, conservação de espécies, conservação de gametas e embriões de animais e humanos. Deste modo, com o reconhecimento e evidencia da importância das características e recursos genéticos animais, tanto para produção agropecuária quanto para conservação de espécies ameaçadas, reforça cada vez mais a necessidade de implantação e estruturação de programas de conservação. Embora estes estudos e bancos de germoplasma estejam sendo implantados por todo o mundo a fim de proteger determinadas espécies da extinção (Reid & Hall, 2003; Rawson et al., 2011), e que para muitas espécies o sucesso quanto a criopreservação do genoma masculino já esteja consolidado (sêmen), com oócitos, tecido ovariano e embriões são poucos os relatos que informam efetivos sucessos (Blaxter, 1953; Billard et al., 1995; Tsvetkova et al., 1996; Caffey & Tiersch, 2000; Carolsfeld et al., 2003; Linhart et al., 2005; Tiersch, 2000; Thirumala et al., 2006; Tiersch et al., 2007; Streit Jr et al., 2008a, 2008b; Martinez-Páramo et al., 2009; Viveiros & Godinho, 2009; Khosla et al., 2017; Lujic et al., 2017; Palhares et al., 2020).

O sêmen criopreservado de peixes já é utilizado na reprodução assistida tanto de espécies de produção quando espécies em declínio crítico populacional ou até mesmo em extinção (Fornari et al., 2012). Porém, neste contexto apenas o material genético masculino é preservado, e é possível afirmar que uma porção importante do genoma de uma população pode ser perdido nesse processo. Além disso, a preservação do genoma materno também é importante, pois ao se preservar células gaméticas femininas também se preserva o DNA mitocondrial e mRNAs, os quais são essenciais para os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (Tsai et al., 2009; Ings et al., 2006; Zhang et al., 2007).

Os estudos com criopreservação de oócitos, tecido ovariano e embriões, muito embora tenham resultado num abundante conhecimento acerca da anatomia, fisiologia, biologia, física e química dessas células e tecidos, os mesmos demonstram que ainda não houve um sucesso sólido, impactante e replicável para todos os estágios de desenvolvimento oocitário ou embrionário. A maior parte dos estudos que relata algum sucesso quanto a criopreservação de oócitos e tecido ovariano de peixes, afirmam que o maior índice de viabilidade

são referentes aos folículos em estágios primordiais de maturação, os quais aparentam ser menos afetados pelas técnicas de criopreservação aplicadas (Harvey, 1983; Zhang et al., 1993; Zhang & Rawson, 1995; Hagedorn et al., 1996; 1998; Hagedorn et al., 2000; Cabrita et al., 2003; Isayeva et al., 2004; Robles et al., 2005; Valdez et al., 2005; Edashige et al., 2006; Godoy et al., 2013; Khosla et al., 2017; Marques et al., 2015, 2018, 2019).

2.3.4. Criopreservação de gametas femininos de peixes

Estudos mais recentes têm se concentrado na criopreservação de oócitos e folículos ovarianos de peixes, dado que foi constatado um potencial maior para criopreservação se comparados aos embriões. O fato de possuírem características como por exemplo: serem menores em tamanho, dotados de maior permeabilidade de membrana, menos sensíveis ao resfriamento além de apresentarem um sistema de membranas menos complexo (Isayeva et al., 2004; Zhang et al., 2005a). A maior parte dos estudos aplicados à criopreservação de oócitos de peixes têm se concentrado principalmente em espécies modelo, como Zebrafish (*Danio rerio*) (Anil et al., 2011; Godoy et al., 2013; Guan et al., 2010, Marques et al., 2015, 2019), e espécies de interesse comercial como pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Marques et al., 2018), truta marrom (*Salmo trutta*) (Lujic et al., 2017), (*S. aurata*) (Zhang et al., 2007) e algumas espécies de água doce da América do Sul (Streit et al., 2014).

Os estudos mais antigos sobre criopreservação de gametas femininos de peixes, avaliavam o índice de toxicidade das soluções crioprotetoras (Plachinta et al., 2004), sensibilidade ao resfriamento de oócitos (Isayeva et al., 2004; Tsai et al., 2009), permeabilidade da membrana de oócitos (Zhang et al., 2005; Guan et al., 2008) e criopreservação usando resfriamento lento (Guan et al., 2008; 2010) e vitrificação controlada (Zhang et al., 2007). Estudos mais recentes foram realizados de: resfriamento lento controlado (Guan et al., 2010) e vitrificação de oócitos isolados em estágios iniciais (Tsai et al., 2009a, b), resfriamento lento controlado e vitrificação de folículos ovarianos em tecido ovariano (Anil, 2013; Godoy et al., 2013; Marques et al., 2019) e estudos com vitrificação de tecido

ovariano de zebrafish (Marques et al., 2015). Em resumo, estes estudos citados indicam que a criopreservação de oócitos de peixes apresenta maior potencial de sucesso quando aplicada a folículos ovarianos em estágio inicial, como estágios I e II, sendo os folículos ovarianos em estágio II os candidatos mais promissores. E de modo geral nos diversos trabalhos, os resultados obtidos indicam que a criopreservação desses folículos ovarianos pode ser uma ferramenta indispensável para a conservação de material genético de peixes. No entanto, ainda há a necessidade de estudos massivos que além de definir os protocolos de criopreservação adequados, ainda garantam o maior índice de viabilidade celular após o aquecimento, além de resultados padronizados.

2.4. Agentes Crioprotetores

Os agentes crioprotetores (CPAs) são utilizados para proteger amostras biológicas dos efeitos da criopreservação, e as funções crioprotetores são desempenhadas de acordo com os mecanismos de ação de cada CPA. No entanto, mesmo para CPAs bem conhecidos ainda há dúvidas quanto ao seu mecanismo exato de proteção (Elliott et al., 2017; Raju et al., 2021). De modo genérico os agentes crioprotetores podem ser divididos em dois tipos: permeáveis e não permeáveis. Os CPAs permeáveis são compostos por substâncias de moléculas pequenas, as quais podem passar facilmente pelas membranas celulares. Entretanto, as CPAs não permeáveis são compostas por grandes polímeros de cadeia longa ou açúcares, os quais não conseguem adentrar as membranas celulares. De modo geral, essas moléculas inibem a formação do gelo no ambiente extracelular da amostra e os crioprotetores não permeáveis são geralmente menos tóxicos do que os crioprotetores permeáveis quando em mesma concentração. A utilização de crioprotetores não permeáveis reduzem a quantidade necessária de crioprotetores permeáveis nos meios de criopreservação, dado que simulam os efeitos crioprotetores desempenhado pelas proteínas no interior das células, entretanto no ambiente extracelular (Karow, 1969; Hubálek, 2003; Sputtek & Sputtek 2004; Fuller, 2004). De forma geral os CPAs não permeáveis e atuam na elevação da osmolaridade do

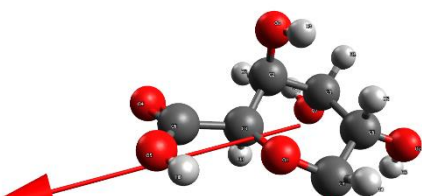
ambiente extracelular, portanto age na desidratação celular, o que consequentemente demanda uma curva de resfriamento mais lenta. Este fenômeno produz uma maior concentração de soluto dentro da célula, o que inibe a formação de gelo intracelular (Meryman, 1971). Assim sendo os CPA não permeáveis, podem ser inclusos aos meios de arrefecimento, pois previnem o choque osmótico e lise celular ao reduzir o gradiente osmótico durante a reidratação e assim, controlando uma possível expansão traumática das células (Elliott et al., 2017; Fuller, 2004). Além disso as CPAs não permeáveis podem absorver água na superfície da membrana celular, inibindo assim a formação de gelo nos arredores imediatos da célula, evitando a formação de redes cristalinas e promovendo a vitrificação (Wolfe & Bryant, 1999; Bryant & Wolfe, 2001; Koster et al., 2000). No entanto, em baixas hidratações, moléculas grandes como polímeros não penetrantes, são excluídas da região da bicamada e não têm efeito nas transições de fase da membrana (Perez & Sputtek, 1994; Wolfe et al., 1999; Koster et al., 2000; Bryant et al., 2001).

O glicerol e DMSO (Mg_2SO_4) são os dois CPAs mais comumente utilizados, e ambos são intra-celulares, no entanto exercem algum efeito citotóxico, o que limita seu uso (Crowe et al., 2004; Sputtek & Sputtek et al., 2004; Shu et al, 2014; Capicciotti et al., 2015). Para atravessar a membrana celular, os CPAs permeáveis são frequentemente moléculas pequenas, não iônicas, altamente solúveis em água à temperatura ambiente (Lovelock, 1954; LoveLock & Bishop, 1959; Meryman, 1971; Hubálek, 2003). Grupos comuns de CPAs permeáveis incluem moléculas que consistem em sulfóxidos, álcoois, amidas e imidas (Hubálek, 2003). CPAs permeáveis têm múltiplos mecanismos de ação, embora, conforme contextualizado anteriormente, a contribuição total destas para a preservação de diferentes tipos de células ainda não seja totalmente compreendida. Devido à sua natureza penetrante e, portanto, à sua capacidade de interagir com componentes celulares, incluindo enzimas, os CPAs permeáveis tendem a ser mais tóxicos do que os não permeáveis (Elliot et al., 2017).

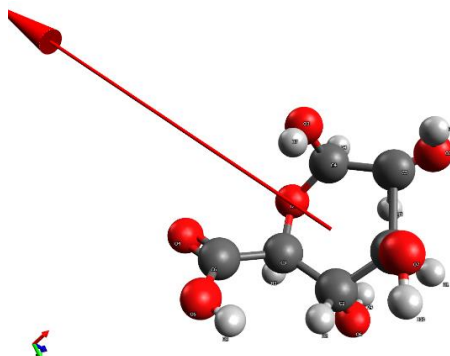
2.5. Alginato de Sódio

O alginato é um polissacarídeo abundante na natureza e ocorre tanto como componente estrutural em algas marinhas marrons (feofíceas), quanto como polissacarídeo capsular em bactérias do solo. Os alginatos são utilizados de forma geral pela indústria alimentícia, médica, farmacêutica e têxtil e o seu uso está em grande parte relacionado com a sua capacidade de reter água, bem como às suas propriedades de gelificação, viscosidade e estabilização. As aplicações biotecnológicas são baseadas em sua reticulação física instantânea e quase independente da temperatura e sua transição líquido/gel na presença de cátions multivalentes (por exemplo, Ca^{2+}) em meio aquoso (Draget et al., 2005). A sua utilização na forma de gel, é bastante destacada principalmente por consistir num processo simples e econômico, além disso o gel de alginato detém propriedades mecânicas altamente ajustáveis (Donati et al., 2009). Dentre outras propriedades do gel de alginato, citamos a sua capacidade de reter grandes quantidades de fluido, o que torna seu uso interessante como matriz de imobilização em diversas aplicações, que vão desde o transporte e deposição de substâncias (drogas) (Josef et al., 2010), células e até mesmo genes em aplicações terapêuticas (Smidsrod et al., 1990), até disponibilização específica de substâncias diretamente a mucosa, graças a propriedade de bioadesividade dos alginatos (Bitton et al 2006). Além disso, mais recentemente tem sido utilizado como encapsulador para o transplante de folículos (Rios et al., 2018)

Os alginatos são copolímeros lineares compostos de resíduos α -L-gulurônicos (G) e β -D-manurônicos (M) ligados (1 \rightarrow 4) em sequências variadas (Figuras 3a e 3b), dependendo do organismo e tecido dos quais está isolado. As cadeias são compostas por uma sequência aleatória de blocos M e G intercalados com regiões de blocos MG alternados cujas frequências de mônada, diad e tríade são conhecidas (Grasdalen et al., 1983; Stokke et al., 1991) Os alginatos, em geral são moléculas rígidas em função da sua composição de anéis glicerais, a qual possui seis membros rígidos e rotação restrita em torno da ligação glicosídica. Além disso repulsão eletrostática entre



os grupos carregados na cadeia do polímero reforça a rigidez das cadeias (Hecht & Srebnik, 2016). A rigidez da cadeia é conhecida por depender não apenas da força iônica, mas também de composição do alginato, aumentando na ordem $MG < MM < GG$ (Smidrod et al., 1973). Portanto, as propriedades físicas e mecânicas do alginato (Figura 4) dependem fortemente da sequência desses blocos (Draget et al., 2005).



(a)

Figura 3: Conformações moleculares de: a) α -L- Guluronato e b) β -D- Guluronato. Imagens obtidas a partir do softwar de AVOGADRO conforme Hanwell e colaboradores (2012).

A gelificação do alginato resulta das interações entre os íons cálcio (Ca^{2+}) e os resíduos G, que levam a associação cadeia-cadeia e à formação de zonas de junção. A ligação seletiva de Ca^{2+} foi encontrada para aumentar

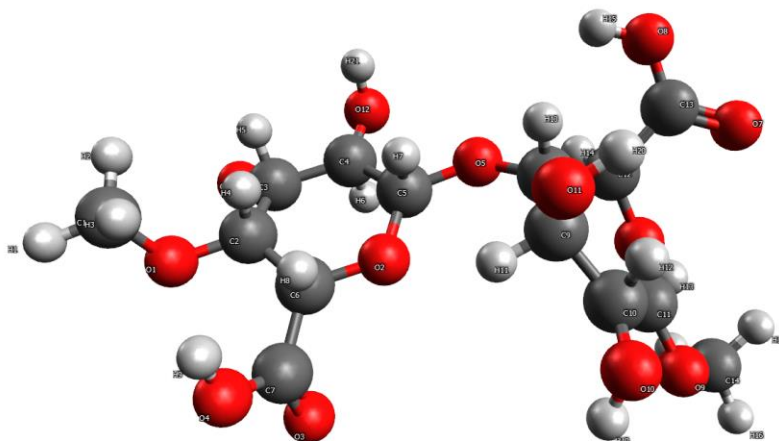


Figura **Erro! Nenhum texto com o estilo especificado foi encontrado no documento.**-3: Dímero GG. Completar o texto da chamada da figura 4

marcadamente com o aumento do conteúdo de resíduos G nas cadeias, enquanto os blocos poli-M e blocos MG alternados têm menor seletividade em relação ao Ca^{2+} (Haug et al., 1970) Essa alta seletividade de ligação iônica ocorre através da formação de aglutinações ou aglomerações denominadas "caixa de ovo", as quais consistem na associação de regiões da cadeia ricas em G (Grant et al., 1973).

A afinidade dos alginatos para o Ca^{2+} aumenta de acordo com a elevação da concentração deste íon no gel, e isso ocorre devido a um mecanismo de zíper autocoooperativo (Smidsrod et al., 1972). Este primeiro estágio de dimerização é seguido por um segundo estágio de associação dos dímeros que é modulado pela elevação nas concentrações de Ca^{2+} . A adição de blocos G isolados e purificados atuam como moduladores de gel, formando zonas de junção de ordem superior compostas por duas ou mais cadeias (Draget et al., 1997). Os blocos M e MG (Figura 5 b e c, respectivamente) têm uma estrutura muito mais plana com mais ninhos rasos para os cátions ocuparem e, portanto, sua seletividade para a ligação de Ca^{2+} é menor, levando à complexação apenas em concentrações de íons mais altas (Grant et al., 1973; Hecht & Srebnik, 2016). Sequências de poli-alternância têm sido considerado incapazes de ligar cooperativamente íons Ca^{2+} e formar zonas de junção da mesma forma que os blocos G, (Vold et al., 2006), já que a ligação MG leva a uma mudança abrupta da direcionalidade local (Figura 5C), dando origem a

"Torções" nas cadeias e uma diminuição no módulo de Young (Donati et al., 2005; Braccini et al., 1999).

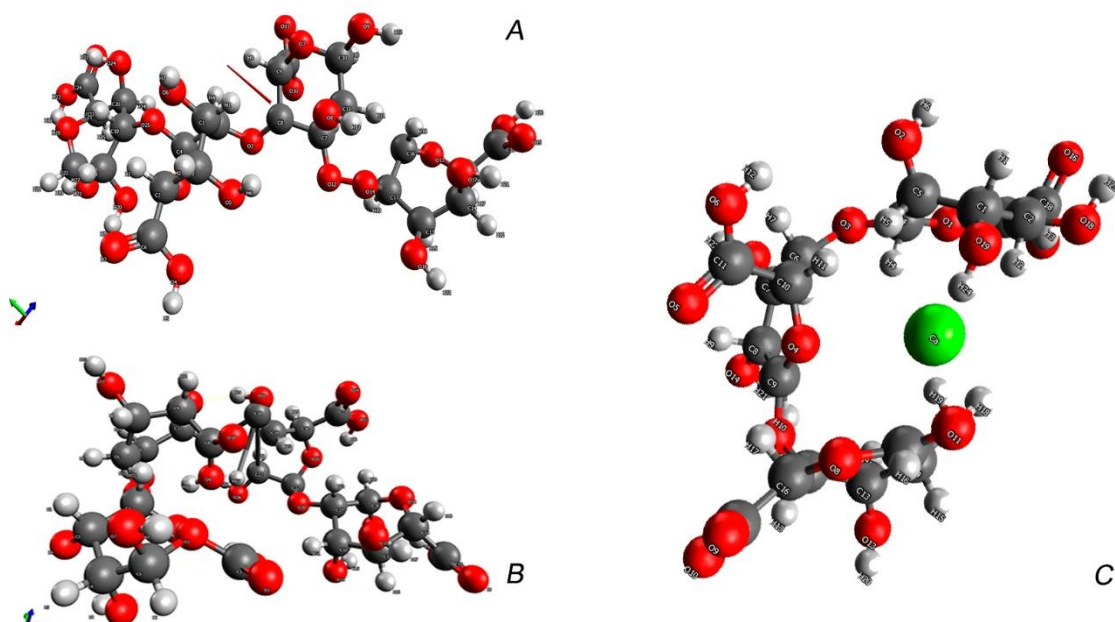


Figura *Erro! Nenhum texto com o estilo especificado foi encontrado no documento.*-4: (a) Poly-G (GGGG); (b) Poly-M (MMMM);(c) Molécula de Alginato Poly-GM + Ca⁺⁺ (AVOGADRO).

Os primeiros estudos computacionais focaram na quelação de Alginato-Ca²⁺ (Braccini et al., 1999, 2001; Mackie et al., 1983). O processo de gelificação de dois estágios foi corroborado, onde a formação de dímeros fortemente ligados foi mostrada ser seguida pela formação de associações interdímeros fracas governadas principalmente por interações eletrostáticas (Plazinsk et al., 2011, 2012). Pouco menos de uma década Stewart et al. (2014) definiram o modelo de ligação de íons sódio e cálcio às cadeias decâmeras simples e múltiplas poli-G, poli-M (Figura 5 a e b) e poli-GM. Nos referidos estudos os pesquisadores descobriram que as diferentes sequências moduladas por ligações com íons afetavam o início da agregação da cadeia. As diferentes associações eram consistentes com condições similares publicadas na forma de imagens anteriores, exibindo redes de gel de alginato (Decho et al., 1999). O início da formação da cadeia é uma etapa fundamental, dado que a sequência de monômero exerce uma grande influência nas propriedades do gel de alginato, pois sequências monoméricas completamente aleatórias são caracterizadas e correspondentes ao alginato natural.

2.6. Zebrafish (*Danio rerio*)

O zebrafish (*Danio rerio*) (Figura 6) é um peixe teleósteo, ovíparo, nativo das bacias hidrográficas dos arredores do leste da Índia, sendo também encontrados no Paquistão, Bangladesh, Nepal e Birmânia (Axelrod & Schultz, 1955). Esta espécie vem sendo utilizada como modelo animal desde os anos 70 (Streisinger et al., 1983). Ao longo dos anos tornou-se referência como modelo



Figura Erro! Nenhum texto com o estilo especificado foi encontrado no documento.-5: Fêmea adulta de Zebrafish (*Danio rerio*)

ao ser aplicado em metodologias de análise genética no estudo de vertebrados. A partir disso, os subsequentes trabalhos fizeram com que o zebrafish se tornasse uma das mais valiosas ferramentas para as mais variadas áreas da pesquisa.

Dentre as vantagens de se utilizar esse animal como modelo em experimentos destaca-se o fato de atingir a maturidade sexual por volta de 10-12 semanas de vida, e a partir disso as fêmeas podem desovar a cada 2 a 3 dias. Cada uma pode liberar centenas de oócitos por vez, o que possibilita a aquisição de várias gerações durante o ano; além disso, o tamanho diminuto, fácil manejo e reprodução, resultam em baixos custos de manutenção (Lawrence, 2007). Além desses aspectos, os embriões dessa espécie são transparentes, permitindo a literal visualização da origem e formação dos tecidos; são altamente susceptíveis à mutagenese, que por sua vez possibilita a realização de estudos genéticos diversos. Além disso, ainda possui o genoma completamente descrito, e um comprovado alto grau de semelhança genética com humanos, a

qual supera os 70%, possuindo 12.719 genes em comum (Howe, et al., 2013). Estes fatores possibilitam o estudo de doenças e fenômenos de forma extremamente controlada, com resultados científicos detalhados, relevantes, replicáveis e confiáveis. O zebrafish também já foi utilizado como modelo animal para estudos que vão desde a criação de outros peixes até biotecnologias e ciências médicas relacionadas a fisiologia da regeneração de tecido nervoso em humanos (Bilota, et al., 2001; Abrahan, et al., 2009; Mathur, et al., 2010; Vettori, et al., 2011; De-Sheng, et al., 2013; Tobia, et al., 2013; Tran & Gerlai, 2014; Wu, 2014; Li, et al., 2015).

2.6.1. Reprodução e estrutura ovariana de Zebrafish

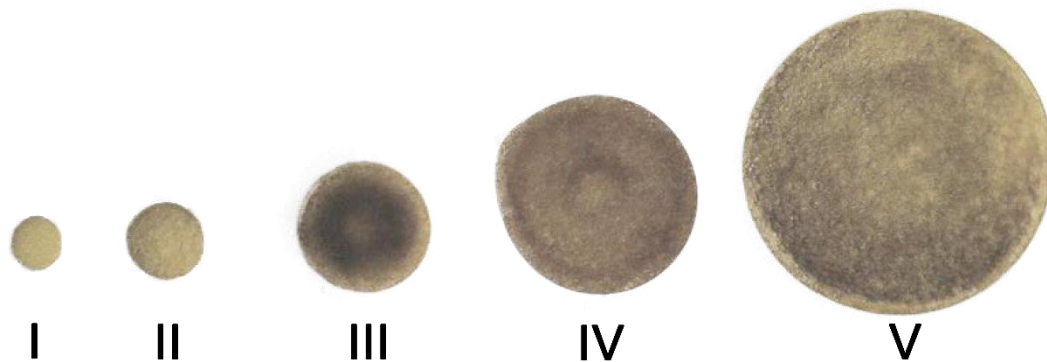
As fêmeas de zebrafish possuem um par de ovários alongados, os quais durante o período fértil podem ocupar mais de 40% do espaço da cavidade abdominal, e encontram-se distribuídos bilateralmente entre a parede abdominal e a bexiga natatória. A estrutura é suportada por um mesovário vascularizado e quanto ao tamanho médio dos ovários, varia de acordo com a idade, tamanho e estágio de maturação, os quais podem atingir pouco mais de um centímetro quando aptos a desova. Durante a desova, os oócitos são conduzidos para o meio externo através de um curto oviduto (Menke, et al., 2011). A distribuição dos oócitos organiza-se na forma de aglomerados (ninhos) e a mesma pode ser averiguada via microscopia de luz, onde os estágios mais jovens dispõem-se centralmente e os mais maduros, de forma gradativa as regiões periféricas do ninho de oócitos (Selman et al., 1993, Connolly, et al., 2014). Essa espécie, embora possua sexos de forma separada (gonocorísticos), é classificada como hermafrodita transitório, dado que durante o período larval (10 a 25 dias) pós-fecundação, as gônadas desenvolvem-se inicialmente na forma de ovários (Dranow, et al., 2013). Ao longo do desenvolvimento, aproximadamente metade da população sofre degeneração do tecido ovariano o qual é colonizado por células somáticas, conferindo às gônadas características intersexuais, ao final desse período, as gônadas degeneradas são convertidas em testículos (Devlin & Nagahama, 2002).

Ao contrário dos mamíferos, que possuem uma quantidade limitada de oócitos, os vertebrados não mamíferos, de alta prolificidade, como é o caso do zebrafish, o número de oócitos pode ser considerado infinito (Draper, et al.,

2007), pois, as células germinativas mitóticas dessas espécies apresentam características citológicas de oogônias, dessa forma a formação e liberação de oócitos é contínua e por tempo indeterminado (Nakamura, et al., 2011).

2.6.2. Oogênese em Zebrafish

Como citado anteriormente os gametas femininos de zebrafish dispõem-se aninhados, cuja as regiões corticais dos são povoadas por células gaméticas primárias, como oogônias e oócitos primários em meiose. Embora esses aglomerados de gametas primordiais situem-se no lúmen do ovário sua origem não pode ser determinada. A proliferação oogonial em ovários adultos de zebrafish, ou seja, a distinção de oogônias e oócitos em meiose durante a fase precoce (leptóteno) é praticamente impossível utilizando apenas critérios morfológicos. No entanto, oogônias e oócitos recém-formados, podem ser facilmente distintas das células somáticas do ovário, dado seu grande tamanho e proporção entre citoplasma e núcleo. As células germinativas são geralmente esféricas, com aproximadamente de 20 μm de diâmetro. Segundo Selman et al. (1993), a oogênese do zebrafish pode ser dividida em cinco estágios ou fases. Dessa forma, o início da oogênese ocorre com o crescimento primário dos oócitos ainda dentro do nionho (fase I) e termina na ovulação (fase V) (Figura 7).



Estágio I: *Caracterizado pelo crescimento primário*, onde complexo oócito/folículo desenvolve-se indo de 7 à 140 μm de diâmetro. Durante essa fase ocorre o crescimento inicial dos oócitos, os quais avançam através dos estágios iniciais da prófase, até pararem no diplóteno da primeira divisão meiótica (Hisaka, et al., 1962) e o primeiro folículo definitivo é formado. Em zebrafish, o estágio I, pode ser dividido em dois sub-estágios, e estes podem ser identificados por eventos nucleares e pela localização do oócito, inicialmente dentro do ninho e posteriormente dentro do folículo. Portanto, denomina-se a fase IA como fase pré-folicular, onde o oócito encontra-se dentro do ninho de oócitos e, normalmente, todos eles encontram-se na mesma fase da divisão celular (prófase da meiose). Inicia-se a fase IB quando o oócito deixa o ninho e situa-se dentro de um folículo.

Estágio II: *Também chamada de fase alvéolo cortical*. Os oócitos podem ser distinguidos pela formação de alvéolos corticais de tamanhos diferentes. Esta fase também foi denominada como vitelogênese primária. Os alvéolos corticais são vesículas de glicoproteínas limitadas por membranas e estão localizadas próximas aos aparelhos de Golgi. O número e volume dos alvéolos corticais aumentam de acordo com o crescimento do oócito, preenchendo o ooplasma. No interior do ooplasma, mitocôndrias alongadas permanecem fortemente associadas às cisternas do retículo endoplasmático granuloso, e tornam-se mais numerosas próximas ao córtex.

Durante o início do estágio II ocorre a formação da segunda camada, entre a camada inicial (formada no início do estágio I) e o oolema. As três camadas referem-se à zona radiata externa, e as duas zonas radiatas internas formando então a tri camada do envelope vitelino. No início da vitelogênese, o envelope vitelino tem cerca de 6,0 μm . As células foliculares tornam-se cubiformes, e continuam a se dividir em torno do ao redor do oócito durante o crescimento e esses mantem-se ligados uns aos outros por numerosos desmossomos e outras junções intercelulares (Kessel, et al., 1988).

As células especializadas que podem ser identificadas como fibroblastos dentro da teca, também podem ser chamadas de células intersticiais do ovário. (Yamamoto, et al., 1968; Lambert, et al., 1978). Essas células não são numerosas ou bem desenvolvidos nos folículos em fase I, no entanto a partir da fase II e pelo resto de desenvolvimento, elas aumentam em número e tamanho. Completamente diferenciadas, são encontradas em aglomerados ao lado de capilares dentro da teca. Ultraestruturalmente, as células especializadas da teca exibem características típicas de células secretoras de esteroides, ou seja, eles têm numerosas mitocôndrias embaladas com cristas tubulares numa matriz densa e exibem diferentes perfis de retículo endoplasmático liso (Christensen e Gillim, 1969). Em contraste, os fibroblastos, que são mais numerosos dentro do teca, apresentam menos mitocôndrias (com cristas achatadas), e contêm ribossomos livres e quantidades moderadas de retículos endoplasmáticos rugoso e liso.

Estágio III: *Vitelogênese*. Os novos folículos tornam-se cada vez mais opacos durante o estágio III, e a vesícula germinal apresenta-se completamente escura. A característica mais importante do estágio III é o crescimento do oócito, onde ele aumenta de tamanho, principalmente devido ao acúmulo de vitelo. A vitelogenina é depositada no oócito por endocitose e, posteriormente, transformada em proteínas de vitelo que se acumulam no limite do envelope vitelínico (Wallace, et al., 1985). Com o contínuo aumento no volume de vitelo o envelope vitelínico torna-se progressivamente mais fino e mais eletrodense, enquanto as células da teca especiais continuam a crescer e multiplicar. As células do folículo permanecem cubiformes e ocorre a proliferação de retículos endoplasmáticos rugosos e lisossomos. No interior do oócito, a vesícula germinal se torna menos achatada e desenvolve um contorno suave, e ao final dessa fase

começa a migrar para longe do ooplasma central. Os nucléolos são reduzidos gradativamente, e os menores nucléolos permanecem próximos ao centro da vesícula germinal. Os corpúsculos e o vitelo acumulam-se centralmente no interior do oócito, e os alvéolos corticais são progressivamente deslocados para a região periférica do oócito. Partículas de glicogênio tornam-se visíveis dentro do ooplasma, e ao final da vitelogênese, os folículos tornam-se sensíveis aos estímulos hormonais endógenos e são recrutados para a maturação.

Estágio IV: *Maturação do oócito*. Durante o estágio IV, a divisão meiótica é reiniciada, a vesícula germinal migra para a periferia do oócito, o envelope nuclear se rompe, ocorre a primeira divisão meiótica, e os cromossomos entram na segunda metáfase meiótica, e ficam nesta fase até a migração para futuro polo animal. Neste ponto, o oócito torna-se um óvulo (Selman e Wallace, 1989). Antes da ovulação, os folículos retraem-se a partir do oócito e seus processos microvilosos continuam presos aos canais do envelope vitelínico, mesmo após da ovulação.

Estágio V: *Ovo maduro*. Os ovos maduros são liberados no lúmen do ovário, e são pouco menores do que os folículos que os originaram. Uma camada de alvéolos corticais é encontrada dentro do córtex. Ao contrário do que se observa na maioria dos teleósteos, gotículas lipídicas nunca são vistas dentro de ovos de zebrafish ou oócitos em quaisquer estágios de desenvolvimento, embora o vitelo contenha lipídios (Malone, et al., 1963).

3. Hipóteses e objetivos

A *hipótese geral* do estudo pressupõe a possibilidade de utilizar o Alginato de sódio como agente crioprotetor não permeável.

O estudo teve como *objetivo geral* avaliar a capacidade do alginato de sódio como crioprotetor extracelular para tecido ovariano de Zebrafish.

Os *objetivos específicos* foram:

1: Testar uma concentração padronizada de alginato de sódio com diferentes soluções crioprotetores.

2: Avaliar os índices de viabilidade celular após a criopreservação.

3: Avaliar o desempenho do alginato de sódio como crioprotetor não permeável e atóxico.

4: Avaliar a possibilidade de que a adição de alginato de sódio à solução de vitrificação pode reduzir o efeito citotóxico das outras soluções crioprotetoras.

CAPÍTULO II

The effect of equilibrium time in combination of different vitrification solutions for optimization of zebrafish ovarian tissue vitrification protocol

The effect of equilibrium time in combination of different vitrification solutions for optimization of zebrafish ovarian tissue vitrification protocol

Itamar C Gomes¹, Andrea G Galuppo¹, Rômulo B Rodrigues¹, Jhony Benato¹, Thales L Flores¹, Jéssica Petry², Douglas Gamba², Leandro C Godoy¹, Danilo P Streit Jr¹

¹Aquaculture Laboratory-AQUAM, Rio Grande do Sul Federal University, RS, Brazil; ²Biochemistry Department, Rio Grande do Sul Federal University, RS, Brazil

Emails: itamar_cossina@yahoo.com.br, andreagalupo@yahoo.com.br, rrodrigues1903@gmail.com, jhonybenato@hotmail.com, thalesflores@hotmail.com, jessicaftcp@gmail.com, douglas.gamba@ufrgs.br, leandro.godoy@ufrgs.br, danilo.streit@ufrgs.br

ABSTRACT

It is established that the use of cryoprotectants is essential for viability after vitrification. In addition to that they are also toxic under certain conditions such as high concentrations and temperatures. The aim was to evaluate the effect of equilibrium times and vitrification solutions on the viability of zebrafish ovarian tissue after vitrification. The ovarian tissue was fragmented and distributed in experimental groups according to the equilibrium times (1, 7 or 15 min) and vitrification solutions. The vitrification solutions used were L-15, 1.5 M methanol and 4.5 M propylene glycol (VS1) or VS1-S associated with 0.5 M sucrose (VS1-S or 2% alginate (VS1-A), and L-15, 1.5 M methanol and 5.5 M Me₂SO (VS2) or VS4 associated with 0.5 M sucrose (VS2-S) or 2% alginate (VS2-A). After equilibration, the fragments were exposed to respective vitrification solutions and immersed in N₂L. The cell viability was evaluated by the trypan blue test and the MTT assay. It was possible to see that oocytes vitrified with solutions based on VS1 seems to work better at 7 and 15 min. When the base was VS2, it was observed that most of the groups showed a significant drop in the rate of intact membrane only SV2 and SV2-A showed results similar to fresh tissue. For the MTT assay the combination of VS, equilibrium times, and fresh tissue showed a significant drop in the mitochondrial activity for 15 min equilibrium time. These data lead us to rethink the vitrification protocols that use times superior than 7

min in equilibrium, considering the potential cytotoxicity of the cryoprotectants commonly used and probably the excess of time before vitrification.

Key words: Cryopreservation, DMSO, Propyleneglycol, Sodium alginate, Viability

INTRODUCTION

The development of effective animal preservation programs regarding endangered species is based on different *ex situ* conservation methods as captive breeding and cryobanking of animal cells and tissues (Liu et al., 2019; Rivers et al., 2020). However, the animal conservation programs presented limitations, since for many species the circumstances under which reproduction occurs are not known or cannot be easily replicated in captivity (Rivers et al., 2020). As an alternative to the preservation of species the cryopreservation of cells and tissues allow the maintenance of cells viability for indefinitely time which enables it use as source of genetic material to restore biodiversity (Rivers et al., 2020). Therefore, organization of cryobanking for samples from endangered fish species has become an important tool to store their genetics (Liu et al., 2019; Rivers et al., 2020). Meantime it is important to develop and/or improve cryopreservation protocols aiming the biggest viability rates possible, producing healthy cells after thawing, to optimize the results from the manipulation of the gametes and embryos.

It is well established that the use of cryoprotectants is essential for the maintenance of cell viability after cryopreservation procedures such as vitrification (Best, 2015). The vitrification is currently considered to be the best protocol to cryopreserve human and animal cells with high chilling sensitivity, such as oocytes and embryos (Zang et al., 2020; Marques et al., 2019; Jin and Mazur, 2015). The basis of vitrification is the use of high concentrations of cryoprotective solutes associated with rapid cooling rates (Jin and Mazur, 2015). That technique presents many advantages as the absence of ice formation, promoting higher viability rates, and ease application in the field or laboratory, because there is no need of specialized equipment, especially when compared with controlled slow cooling (Guan et al., 2010). Despite the advantages of the

vitrification the need of high concentrations of cryoprotectants was proved to be related to serious osmotic and toxic cell damages (Guan et al., 2010). The knowledge of the toxicity mechanisms related to cryoprotectants will guide us understanding how to reduce its toxicity in order to obtain successful cell, tissues and organ cryopreservation (Best, 2015).

Therefore, to develop an efficient vitrification protocol for female fish gametes and tissues is important to consider some factors in the vitrification dynamics as the cryoprotectants selection used alone or in combination; the toxicity of different types and concentrations of cryoprotectants; the equilibrium time and temperature; the device selected for vitrification and the warming curve followed by the removal of cryoprotectants (Guan et al., 2010; Zampolla et al., 2011). Besides that, the cryopreservation of fish oocytes and eggs brings one more challenge since, differently from the mammals oocytes and eggs, their large size seems to limit the penetration of cryoprotectants, allowing the intracellular ice formation during cooling, which can be deadly (Tsai 2009). That belief in the limitation of cryoprotectants penetration on fish oocytes and eggs lead to the use of equilibrium times, prior to vitrification, longer than ten minutes which can be one cause of the lower viability after warming. This study brings important information about the ovarian tissue vitrification process, considering the relation between equilibrium time and the cryoprotectants solution used and the viability after warming. Also we was [ACNV1] evaluate different cryoprotectants combinations, including a biomaterial, to optimize the vitrification protocol for fish ovarian tissue cryopreservation.

MATERIALS AND METHODS

The study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul. Project number: 37996 and conducted by the National Council for Control and Animal Experimentation.

Animals

The animals were maintained in filtered and aerated 40 L aquaria at 27°C under a photoperiod 14/10 h (light/dark), they were fed with TetraMin® dry flake

fish food (Tetra, Germany) four times a day. A total of 56 animals were used in this study.

Ovarian fragment collection

For euthanized the animals a lethal dose of tricaine methane sulfonate (0.6 mg/mL) was used. They were exposed to the tricaine for approximately 5 min and then decapitated. The female zebrafish used in the study presented total length of 4.1814 cm (\pm 0.2693) and average weight of 0.5782 g (\pm 0.1693). The gonads selected for cryopreservation protocols weighted 0.0611 g (\pm 0.0401). The medium Leibovitz L-15 (pH 9.0; 90%) supplemented with L-glutamine were used for ovary collection. The fragments produced measured about 2 x 2 mm and it was performed under Nikon's SMZ 745 stereoscopic microscope with X 4 zoom. The fragments were randomly distributed among the experimental groups.

Experimental design

Considering that the cryoprotectants were in the limit between damaging and protecting the cells from cryogenic injuries according to the environmental conditions, the experiment consisted of evaluate the effect of different cryoprotectant solutions submitted to different equilibrium times on cell viability after vitrification of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian tissue fragments. [ACNV2] The vitrification procedure was based on the tissue fragments exposure to an equilibrium solution (ES), then to a vitrification solution (VS) (Figure 1). The exposure to the ES were performed by 1, 7 or 15 minutes, according to the experimental group. The VS exposure time was 90 seconds for all experimental groups, independently of the ES time of exposure.

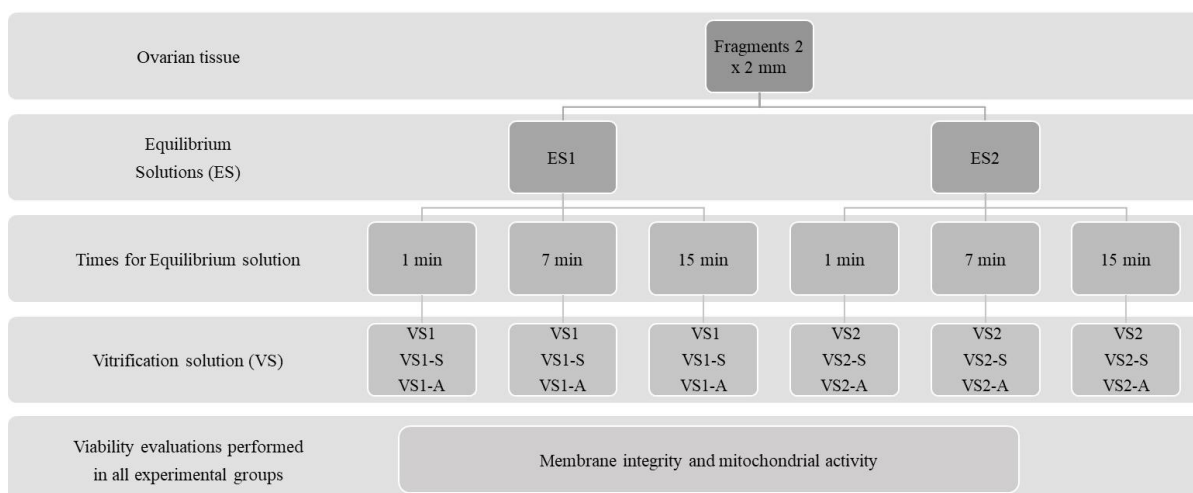


Figure 1: Experimental design showing the different experimental groups, and the combinations of equilibrium solutions, equilibrium times and vitrification solutions.

Equilibrium and vitrification solutions

The different ES were L-15 90% and 1.5 M methanol associated with 2.25 M propylene glycol (E1) or 1.5 M methanol associated with 2.75 M Me₂SO (E2). The vitrification solutions used were L-15, 1.5 M methanol and 4.5 M propylene glycol (VS1) or 1.5M methanol and 4.5 M propylene glycol associated with 0.5 M sucrose (VS1-S) or 2% alginate (VS1-A), and L-15, 1.5 M methanol and 5.5 M Me₂SO (VS2) or 1.5 M methanol and 5.5 M Me₂SO associated with 0.5 M sucrose (VS2-S) or 2% alginate (VS2-A). The ES1 were used for the VS1, VS1-S and VS1-A and the ES2 were used for VS2, VS2-S and VS2-A. The experimental groups tested were ES1/VS1, ES1/VS1-S, ES1/VS1-A and ES2/VS2, ES2/VS2-S and ES2/VS2-A (Table 1).

Table 1: Scheme of the solutions used during the vitrification protocol showing the correspondence between the ES and the respective VS.

Equilibrium solution*	Vitrification solution*	Experimental groups
ES1 1.5M methanol 2.25M propylene glycol	1.5M methanol 4.5M propylene glycol	VS1
	1.5M methanol 4.5M propylene glycol 0.5M sucrose	VS1-S
	1.5M methanol	VS1-A

	4.5M propylene glycol 0.5M sucrose	
ES2 1.5M methanol 2.75M Me ₂ SO	1.5M methanol 5.5M Me ₂ SO	VS2
	1.5M methanol 5.5M Me ₂ SO 0.5M sucrose	VS2-S
	1.5M methanol 5.5M Me ₂ SO 2% alginate	VS2-A
ES1 1.5M methanol 2.25M propylene glycol	1.5M methanol 4.5M propylene glycol	VS1
	1.5M methanol 4.5M propylene glycol 0.5M sucrose	VS1-S
	1.5M methanol 4.5M propylene glycol 2% alginate	VS1-A
ES2 1.5M methanol 2.75M Me ₂ SO	1.5M methanol 5.5M Me ₂ SO	VS2
	1.5M methanol 5.5M Me ₂ SO 0.5M sucrose	VS2-S
	1.5M methanol 5.5M Me ₂ SO 2% alginate	VS2-A
ES1 1.5M methanol 2.25M propylene glycol	1.5M methanol 4.5M propylene glycol	VS1
	1.5M methanol 4.5M propylene glycol 0.5M sucrose	VS1-S
	1.5M methanol 4.5M propylene glycol	VS1-A

	2% alginate	
ES2 1.5M methanol 2.75M Me ₂ SO	1.5M methanol 5.5M Me ₂ SO	VS2
	1.5M methanol 5.5M Me ₂ SO 0.5M sucrose	VS2-S
	1.5M methanol 5.5M Me ₂ SO 2% alginate	VS2-A

*All ES and VS were diluted in L15 90% pH 9

Vitrification procedure

Each fragment was placed individually at a cryogenic vial and the vitrification was performed as follows. The tissue fragments were first exposed to the ES (300 μ l at 4°C) correspondent to each time and vitrification solution experimental group. The equilibrium time was performed at 4°C. After 1, 7 or 15 min the ES was removed and the respective VS (300 μ l at 4°C) was added on the tissue fragment for 90 seconds. After that time the VS was removed, and the sample was directly plunged at the liquid nitrogen.

Warming

The warming procedure was performed plunged the samples directly from the liquid nitrogen into the water bath at 37°C for 1 min. At that moment a sucrose solution (1 M in L-15 90%) was added to the vial. The initial sucrose solution, after one minute, was substituted by a second sucrose solution (0.5 M). The second sucrose solution was added, at room temperature, for 3 min, then removed and the last sucrose solution (0.25 M) was added for 5 min (at room temperature) then removed and substituted by L-15 90%. Then the samples were submitted to the viability tests.

Membrane integrity evaluation – Trypan blue test

The membrane integrity evaluation was performed by the trypan blue test which is a simple and widely used assay for evaluation of cell viability. Cells with damaged membranes allow the trypan blue into their cytoplasm, which turn the cells cytoplasm blue under the microscope. The cells with intact membranes

remain clear, since they are able to block the trypan blue to enter. The vitrified ovarian fragments were incubated in 0.4% trypan blue solution in L-15 90% for 3 min at room temperature and then washed three times in L-15 90% medium. The fragments were observed under light microscope (X 40) and they were photographed (Cosimmedical – Anatomic - TA-0124-B) for further evaluation. The unstained oocytes were classified with membrane-intact, and the blue stained oocytes were considered membrane-damaged. For each vitrification sample >200 oocytes were evaluated.

Mitochondrial activity assay with modifications

The MTT assay is based on the action of the mitochondrial enzyme succinyl dehydrogenase, that is a reductase, which promotes the reduction of MTT to formazan crystals. That enzyme is active only in living cells allowing the quantification of living cells in a sample. As showed previously with ovary fragments of zebrafish, it was considered that the greater the fragment, the greater the number of cells, because more concentrated will be the formazan in cells cytoplasm and consequently the greater the absorbance value obtained in the reading. That is why we decided to use it for ovarian tissue fragments viability evaluation. The ovarian tissue fragments were incubated with MTT (5 mg/mL) for 2 h at 28 °C protected from light. The temperature of 28 °C was adjusted for zebrafish optimal metabolism, because the MTT assay was patterned for mammalian cells which have an optimal metabolic temperature of 37 °C. After the incubation, the MTT solution (400 µL) was removed and to dissolve the formed formazan crystals dimethyl sulfoxide (400 µL) was added. Then the absorbance analysis was performed at 570 nm on the SpectraMax® 250 Microplate Spectrophotometer. Each sample was analyzed in triplicate.

Statistical analyses

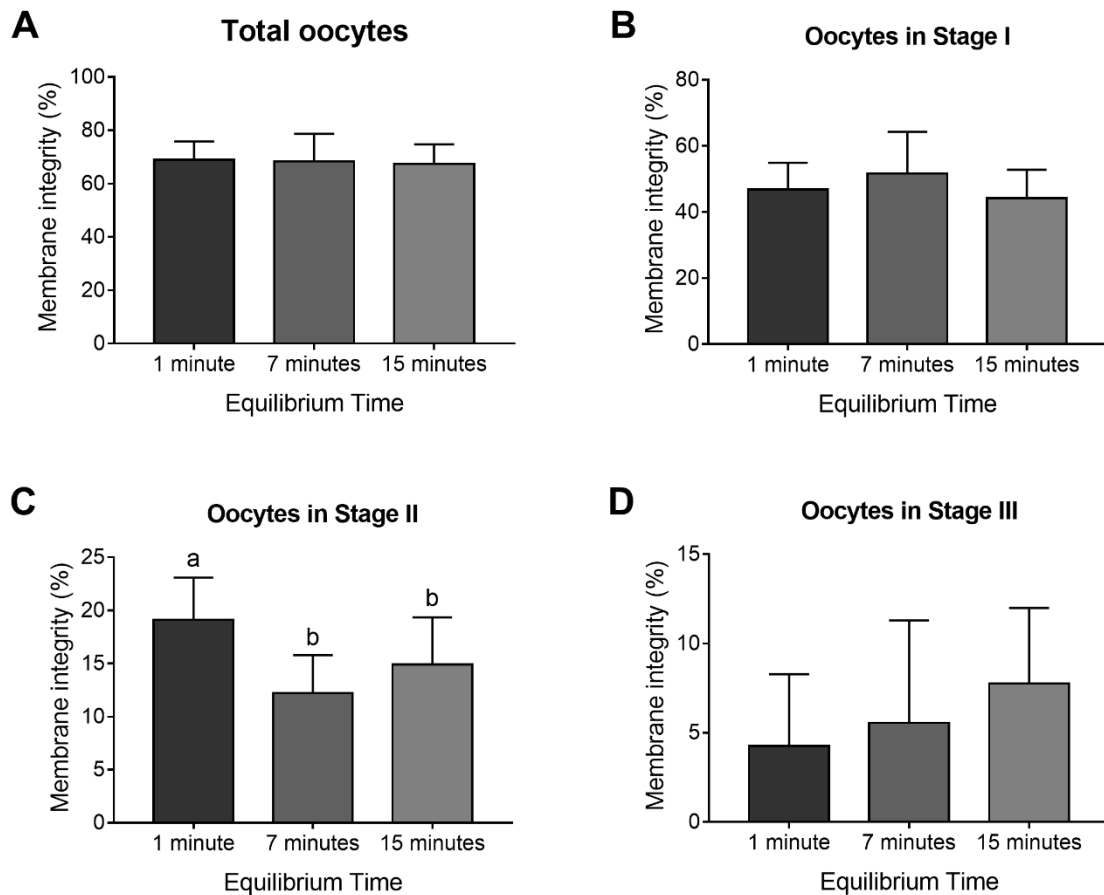
The comparison between the different equilibrium times, without considering the vitrification solutions, was carried out through one-way analysis of variance, followed by the Tukey test, when there was a difference. To verify which vitrification protocol (cryoprotective solution + equilibration time) was

different from the control (fresh), one-way analysis of variance was used, followed by Dunnett test, comparing all groups against the control (fresh) group.

To compare the different vitrification solutions and the equilibrium times, a two-way ANOVA (Two-Way ANOVA) was used, considering as factors the effects of the Treatments (vitrification solutions), the equilibrium time and the interaction between the factors. When a significant effect was observed for one of the factors, Tukey's means comparison test was applied. The data are presented in the figures as mean \pm standard deviation (SD).

RESULTS

The viability from ovarian tissue fragments were evaluated by trypan blue test and MTT assay after warming. The joint assessment of the data from these tests enables the evaluation of oocytes membrane integrity, a morpho-physiological cell feature, and an oocyte metabolic function, the mitochondrial activity, respectively. The data from the membrane integrity was first analyzed considering the three groups of equilibrium time (1, 7 and 15 min) as major groups without considering the vitrification solutions (Figure 2). That evaluation allows us to identify if any of the times tested was better than the others, and it was observed that in general equilibrium times from 1 to 15 min can be used without loss of membrane integrity from oocytes vitrified (Figure 2 A). It was possible to see that only the oocytes in stage II of maturation showed a higher number of cells with intact membrane after warming when the equilibrium was performed at 1 min (Figure 2 C). Oocytes in stage I and III showed no differences among the equilibrium times (Figure 2 A and B).



[ACNV3]

Figure 2: Membrane integrity evaluation among three different equilibrium times, combining all vitrification solutions groups. A) Total oocytes ($P=0.8409$); B) Oocytes in Stage I ($P=0.0788$); C) Oocytes in Stage II ($P<0.0001$); D) Oocytes in Stage III ($P=0.0800$). Different letters indicate a significant difference between the equilibrium times by the Tukey test.

However, when the data from membrane integrity of ovarian tissue fragments submitted to different vitrification solutions were analyzed singly, and considering the different equilibrium times, another cell behavior was identified. It was possible to see that in general the oocytes vitrified with solutions based on the combination of methanol and propylene glycol seems to work better at times from 7 and 15 min since from the three solutions tested at 1 min, only one of them (VS1-S) showed similar results of membrane integrity from the fresh tissue (Figure 3 A). The SV1 showed the best results of membrane integrity at equilibrium times of 7 min and 15 min and the tissue preserved with VS1-S

(methanol / propylene glycol / sucrose) showed the best results in 1 min and 15 min of equilibrium (Figure 3A). And the VS1-A solution, that had sodium alginate as an external cryoprotectant instead of sucrose, showed most cells with intact membrane when was performed the 7 min equilibrium (Figure 3A). Already when the base of the vitrification solution was methanol with DMSO, it was observed that most of the groups tested showed a significant drop in the number of oocytes with intact membrane, considering the fresh tissue results. So from the total of the nine experimental groups (times 1, 7 and 15 min versus VS-2, VC2-S and VS2-A) only three showed results similar to fresh tissue (Figure 3E). These three groups are VS2 (methanol / DMSO) when equilibrated for 1 min and VS2-A (methanol / DMSO / sodium alginate) at 1 and 7 min of equilibrium (Figure 3E). In those groups in which the DMSO was one of the internal cryoprotectors, it was found that the equilibrium time of 15 min was harmful regardless of the combination with the external cryoprotectant.

When evaluating the membrane integrity of each oocyte maturation stage (stages I, II and III were considered), separately, a significant drop in the number of cells with intact membrane was observed compared to fresh tissue, regardless of the vitrification solution and equilibrium time used (Figure 3 B-D and F-H). For oocytes in stage I of maturation, it is observed that both solutions based on methanol with propylene glycol, and those with DMSO presented between 40 to 60% of cells with intact membrane after warming (Figure 3 B and F). When each solution was analyzed according to the equilibrium times, it was observed that only the VS2 solution (methanol / DMSO) showed better results of membrane integrity with equilibrium of 1 min in comparison with the 15 min group (Figure 3F). When considering oocytes in stage II and III of maturation, vitrified in any solution, a decrease in the number of cells with an intact membrane is observed after heating. On average, stage II oocytes showed 20% and stage III oocytes showed about 10% of cells with membrane integrity (Figure 3 C-D and G-H). For these maturation stages, it was possible to identify that some vitrification solutions showed better results at certain equilibrium times. For oocytes in stage II vitrified with the VS1-A solution (methanol / propylene glycol / alginate), the equilibrium time of 1 min showed the best results of membrane integrity when compared to the time of 7 min (Figure 3C). For oocytes II vitrified with DMSO-based solutions, instead of propylene glycol, we observed that the VS2 solution (methanol /

DMSO) showed results similar to VS1-A, with better rates of membrane integrity in 1 min compared to at 7 min. And that in 15 min the VS2 solution showed better results than the VS2-A (methanol / DMSO / sodium alginate), although both (VS2 and VS2-A) were similar to the VS2-S solution (Figure 3G). Finally, despite the low membrane integrity rates found for oocytes in stage III of maturation, it was possible to identify that the solutions VS2 and VS2-S, the DMSO base, presented higher integrity rates in the time of 15 min compared to the time of 1 min, although both resemble each other at 7 min (Figure 3 H). An important observation was that for all groups vitrified with sodium alginate in place of sucrose as external cryoprotectant there was no difference among membrane integrity rates. The oocytes stage IV and V were not evaluated due to their low number in the

samples, and because most of them were found with severe morphological changes making impossible the correct analysis.

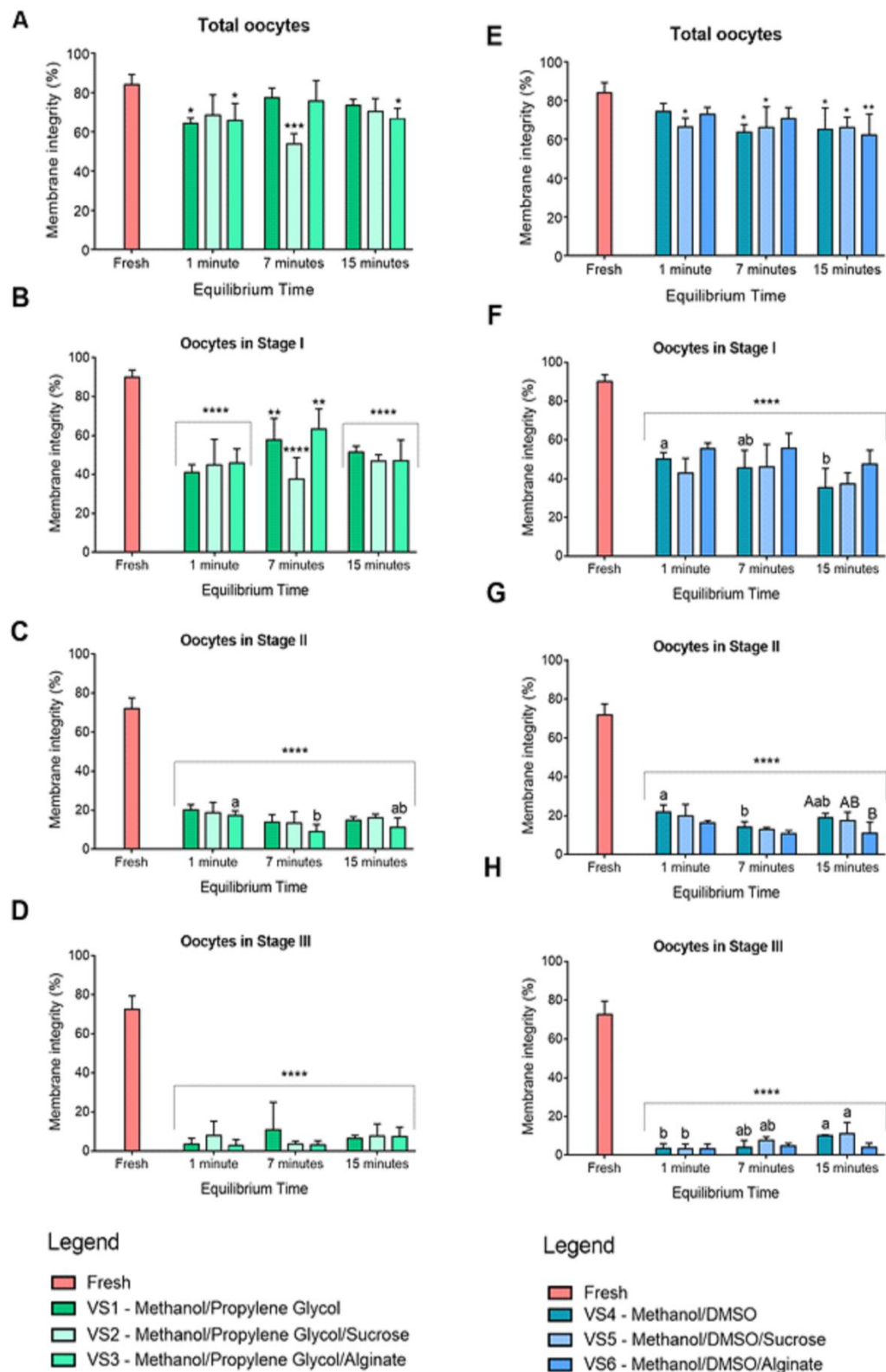


Figura Erro! Nenhum texto com o estilo especificado foi encontrado no documento.-8 (VS1 = VS1, VS2 = VS1-S, VS3 = VS1-A, VS4 = VS2, VS5 = VS2-S and VS6 = VS2-A).

Figure 3: Ovarian tissue fragments membrane integrity (%) evaluation after warming. A) Effect of cryoprotective solutions (CPAS) ($P = 0.1036$), equilibrium time ($P = 0.4866$) and interaction between CPAS and equilibration time ($P = 0.0113$); B) Oocytes in stage I showing the effect of cryoprotective solutions ($P = 0.1110$), equilibrium time ($P = 0.1298$) and interaction between CPAS and equilibration time ($P = 0.0766$); C) Stage II oocytes showing the effect of cryoprotective solutions ($P = 0.0817$), equilibrium time ($P = 0.0048$) and interaction between CPAS and equilibration time ($P = 0.9144$); D) Stage III oocytes showing the effect of cryoprotective solutions ($P = 0.6573$), equilibrium time ($p = 0.7049$) and interaction between CPAS and equilibration time ($P = 0.4636$); E) Effect of cryoprotective solutions ($P = 0.7748$), equilibrium time ($P = 0.1468$) and interaction between factors (CPAS: Equilibration time) ($P = 0.4611$); F) Stage 1 oocytes showing the effect of cryoprotective solutions ($P = 0.0137$), equilibrium time ($P = 0.0242$) and interaction between factors (CPAS: Equilibration time) ($P = 0.8306$); G) Stage 2 oocytes: Effect of cryoprotective solutions ($P = 0.0099$), effect of equilibrium time ($P = 0.0030$) and effect of interaction between factors (CPAS: Equilibration time) ($P = 0.8028$); H) Oocytes in stage 3: Effect of cryoprotective solutions ($P = 0.0742$), effect of equilibrium time ($P = 0.0054$) and effect of interaction between factors (CPAS: Equilibration time) ($P = 0.1801$). Different lowercase letters indicate a difference between the equilibrium time within each cryoprotective solution. Capital letters indicate difference between the cryoprotective solutions, within each equilibrium time. Comparison between vitrified groups and control group (fresh) using the Dunnett test. Asterisks indicate when there is a difference between the vitrified group and the control / fresh group (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$).

The MTT assay data, considering only the equilibrium times (1, 7 and 15 min) as three major groups, without the specificities of each vitrification solutions, allow the identification of a tendency to increase viability from 15 min to 1 min (Figure 4). According to the statistical analysis the grouped data from 1 min presented bigger viability rate than 15 min, although 7 min presented similar results to the other two groups (Figure 4 A). That information was clearly showed in Figure 4 B by the tendency lines. It was also possible to see that, probably for

the majority of the solutions tested (VS1, VS1-S, VS1-A, VS2 and VS2-A), the equilibrium time of 1 min was a better choice in order to keep mitochondrial activity as higher as possible (Figure 4 C).

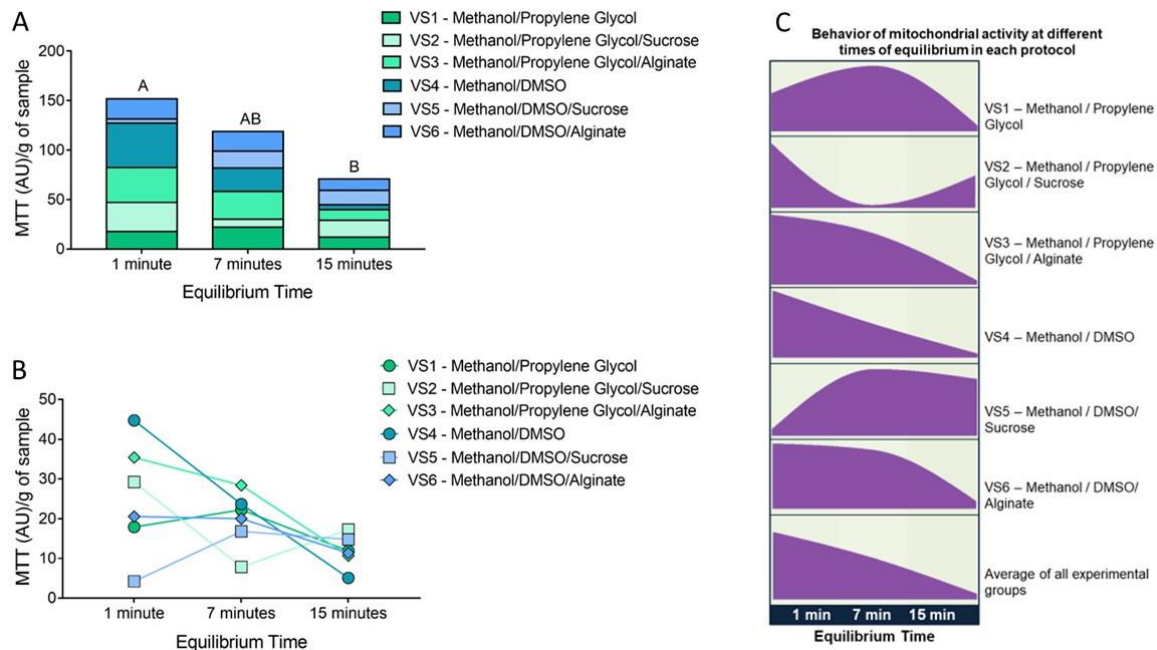


Figure 4: Data from the MTT assay taking equilibrium times as reference for mitochondrial activity evaluation. A - The data comparing the equilibrium times despite the vitrification solution presented statistical difference by ANOVA one way ($P=0.0018$). Different capital letters show difference among equilibrium times by Tukey test. B – Image showing the tendency of improved mitochondrial activity from 15 min to 1 min. C – Sequence of images showing that the mitochondrial activity was similar for almost all groups, concentrating the higher results in 1 and 7 min, except for the VS5 group (Methanol/DMSO/Sucrose).

Considering the combination of vitrification solutions, equilibrium times, and fresh tissue mitochondrial activity of the ovarian tissue fragments a significant drop in the mitochondrial activity (decrease of viability) was observed in the groups submitted to 15 min equilibrium time, in comparison to mitochondrial activity of the fresh tissue (Figure 5 A). In the samples from 7 and 1 min of equilibrium the majority of the groups presented mitochondrial activity similar to the fresh tissue group, despite the vitrification solutions (Figure 5 A). Only samples vitrified in VS1-S (methanol/propylene glycol/sucrose) at 7 min and VS2-

S (methanol/DMSO/sucrose) at 1 min showed statistically significant difference in relation to the fresh group, presenting lower mitochondrial activity after warming (Figure 5 A). It is interesting notice that both VS1--S and VS2-S were groups with sucrose as external cryoprotectants and the groups with sodium alginate were able to keep the mitochondrial activity, and indirectly, the cell viability.

The groups based on methanol/propylene glycol (SV1, SV1-S and SV1-A) evaluated for each equilibrium time (1, 7 or 15 min), individually, presented different results among them (Figure 5 B). The SV1 can be used in an equilibrium from 1 to 15 min with similar results although at 15 min the data showed lower mitochondrial activity when comparing to the fresh tissue. The SV1-S presented better results for 1 min equilibrium when compared to 7 min, similar to the fresh tissue, although the group from 1 min equilibrium comparing to 15 min, but both presented similar results from the 7 min group. Considering that there were no differences between samples for the same equilibrium time the data from the VS1-A solution showed the cryoprotectant potential of sodium alginate when combined with methanol and propylene glycol. The last solution of the three, SV1-A showed higher mitochondrial activity. However, when analyzing each SV separately, it was possible to identify that the SV1-S showed a better result in 1 min of balance when compared to 7 minutes, but both did not show any difference with the group that remained in 15 minutes in balance. the samples vitrified in solutions based on methanol / DMSO it was found that the best combination for the time of 1 minute was with SV1, which even presented mitochondrial activity similar to fresh tissue (Figure 5 C).

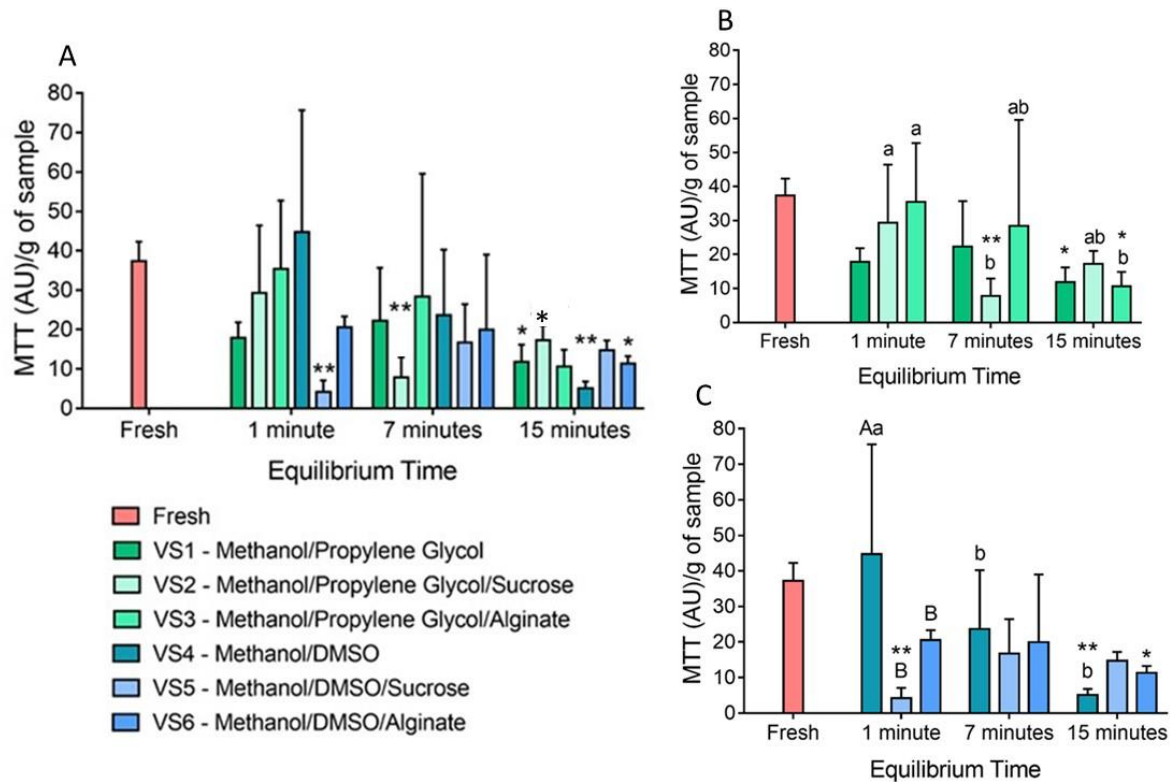


Figure 5: Data from MTT assay comparing the equilibrium time and different cryoprotectants solutions. A – Shows the cryoprotectants solutions ($P=0.0617$), equilibrium time ($P=0.0005$) and combination of both ($P=0.0026$) in the mitochondrial activity. Different small letters show statistical difference among equilibrium time viability for each vitrification solution; B - Shows the cryoprotectants solutions ($P=0.2368$), equilibrium time ($P=0.0168$) and combination of both ($P=0.0821$) in the mitochondrial activity. Different small letters show statistical difference among equilibrium time viability for each vitrification solution; C - Shows the cryoprotectants solutions ($P=0.0311$), equilibrium time ($P=0.0212$) and combination of both ($P=0.0015$) in the mitochondrial activity. Different small letters show statistical difference among equilibrium time viability for each vitrification solution. Different capital letters show statistical difference among vitrification solutions viability for each equilibrium time. A, B and C - It was also performed a comparison among data from the fresh sample and the vitrified groups by Dunnett test ($*P<0.05$; $**P<0.01$; $***P<0.001$; $****P<0.0001$).

DISCUSSION

In order to develop an efficient repository for fish species, research for less toxic and more efficient cryopreservation protocols is an crucial. It is known that there are great difficulties in identify one efficient protocol for cryopreservation of aquatic species, since that animals present heterogeneous responses to cryoprotectants, due to their metabolic evolutionary differences for adaptation to the water environment (Liu et al., 2019). Also, the dynamic and complex process of oogenesis with continuous changes in their structures brings another challenge in relation of the cryoprotective effect and the chilling sensitivity in those distinct moments of gamete production (Lopes et al., 2019). Therefore, the data showed here allow the development of important information about the vitrification process of fish ovarian tissue by the analysis of the relation between the different equilibrium times and the different vitrification solutions used. Two main parameters were used for the quantification of the protocol's success, considering cell viability, which were the oocyte membrane integrity and the mitochondrial activity after warming. Also was evaluate the use of a biomaterial, as external cryoprotectant, the sodium alginate. Sodium alginate is a biomaterial derived from brown algae, with potential for cryoprotectant as previously demonstrate (Mohanty, 2016).

According to the data referring to the oocyte membrane integrity from the three equilibrium times alone (1, 7 and 15 min), without taking into account the vitrification solutions, it was observed that the equilibrium time in general did not interfere on the oocyte membrane integrity after warming (Figure 2A). That fact brings to the idea that, since the membrane integrity rate was almost the same among groups, it will be better if shorter equilibrium times were used in the vitrification protocols. It is known that permeate cryoprotectants are highly cytotoxic under high temperatures which can be easily assessed during manipulation and warming process (Best, 2015). An assay using DMSO showed that dermal fibroblasts exposed in increasing concentrations between 5% to 30% at rising temperatures of 4°C, 25°C, and 37°C for periods of 10, 20, and 30 min showed decreasing cell viability with increasing concentration, temperature, and exposure time (Best, 2015), corroborating to the idea that the shorter the exposure at the equilibrium time the better for the cell health. It was also noted

that for oocytes in stage II of maturation, equilibrium times from 1 min, promoted higher membrane integrity rates after warming, demonstrating the differences in cell sensibility during maturation process (Figure 2C). This feature was also observed in the MTT assay, when the data of equilibrium time was considered alone, without the different vitrification solutions, where it was observed that in 1 min equilibrium the cells showed greater mitochondrial activity than in 15 min (Figure 4A). Therefore, both data showed that shorter equilibrium times work better for the maintenance of oocyte structural and metabolic integrity.

Considering the membrane integrity from each vitrification solution (VS1 to VS2-A) it was possible to see that with or without the use of non-permeating cryoprotectants (sucrose or sodium alginate) some loss of membrane integrity occurs (40-60%) when compared to the fresh tissue (90%), despite the equilibrium time used (Figure 3). According to the data obtained one hypothesis is that the harmful effect observed after the vitrification was due to the use of permeate cryoprotectants, specially at the oocytes in stage II and III of maturation (Figure 3). A previous study showed that oocytes stage III membrane permeability to water and cryoprotectants is higher than more mature oocyte stages (Zhang et al., 2005), which make us think that the cryoprotectants will be able to enter the oocytes even in times shorter than 15 min of equilibrium. The data presented here showed that apparently the toxicity characteristics of each cryoprotectant tested seems to be exacerbated when considering oocytes in more advanced degrees of maturation, as observed in the oocyte membrane integrity rates in stages II and III (Figure 3).

It was already described that methanol can be considered one of the least toxic of the permeate cryoprotectants to zebrafish oocytes but unfortunately at the concentration necessary to achieve vitrification it is highly toxic (Guan et al., 2010). Similar to methanol propylene glycol often exhibits toxicity when used as a cryoprotectant and when used in excess has been shown to impair the developmental potential of mouse zygotes by decreasing intracellular pH (Guan et al., 2010). The DMSO is mostly of the times associated with membrane toxicity. The cell membrane is organized as bilayers with hydrophilic polar head groups at the outer and inner surfaces, and hydrophobic fatty acid chains in the middle, and this structure makes the membrane permeability increase with contact of lipophilic substances and decreases with increasing molecular sizes of molecules

or contact with substances with the ability to form hydrogen bonds (Best, 2015). That last characteristic was found in DMSO, their molecules can bond with water hydrogen, and that bond is several times the lifetime of a water-water hydrogen bond. But with increasing temperatures DMSO bonding with water decreases, and how DMSO is a hydrophobic molecule it concentrates at the lipidic bilayer which may help explain the increasing toxicity of DMSO because it localizes around the polar head groups of cell membranes (Best, 2015). The combination of permeate cryoprotectants minimize the potential individual toxicity by allowing a lower concentration of each and yet get the vitrious state (Guan et al., 2010).

In addition to the problems associated with permeable cryoprotectors described above it was reported that the cryopreservation process of ovarian tissue promoted other harmful effects as disruption of cytoskeleton proteins, actin and tubulin and mitochondrial distribution (Zampolla et al., 2011). Here it was evaluated the mitochondrial activity by the MTT assay and it was clear that despite the vitrification solution times of 15 min of equilibrium previously to the vitrification process reduced significative the mitochondrial function of the oocytes (Figure 5). Therefore, times of 1 min and 7 min produce less damaged in the mitochondria than 15 min. Another observation was that sodium alginate may be used as a substitute for the sucrose and performing equilibrium under 15 min is an important factor for maintaining cell viability of zebrafish ovarian tissue. Part of the damage caused by the cryopreservation of fish oocytes occurs at the plasma membrane. Therefore, the development of more efficient cryopreservation methods depends on the use of substances that protect the integrity of the oocyte membrane during cooling (Marques et al., 2019). The ability to preserve maternal gametes would provide a reliable source of fish genetic material for scientific and aquaculture purposes as well as for conservation of biodiversity. Cryopreservation of oocytes offers several advantages when compared to fish embryos, such as their smaller size, and the absence of a fully formed chorion that may render them more permeable to water and solutes. However, these follicles will need to undergo in vitro maturation, ovulation and fertilization after cryogenic storage [ACNV4](Tsai et al., 2009).

According to the data evaluation it was possible to conclude that the equilibrium time is an important step at the vitrification protocol for maintenance of cell viability after warming. Also, the results showed that it was not possible to

pattern an equilibrium time for all the cryoprotectants combinations, since each combination presented different protective and harmful potential to the oocytes. Therefore, it will be necessary that the equilibrium time will be adjusted for each type of cryoprotective solution selected in the vitrification protocol. Especially in order to reduce the exposure of cells to cryoprotective solutions in vitrification protocols, which tend to be higher in concentrations of cryoprotectants and consequently more toxic. In addition, it was verified the efficiency of using a non-toxic biomaterial, which is sodium alginate. The use of non-permeable cryoprotectants in conjunction with permeable cryoprotectants has great potential, bearing in mind that they can decrease the toxicity of the cryoprotective medium and produce healthier gametes for further reproduction procedures.

Acknowledgments to Professor Itabajara S. Vaz Jr. from the Immunology Laboratory of the Biotechnology Center of Veterinary Medicine Faculty of Rio Grande do Sul Federal University for kindly providing the spectrophotometer used for MTT assays

REFERENCES

- Best BP. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation Research*, 18(5): 422-436, 2015. DOI: 10.1089/rej.2014.1656
- Guan M, Rawson DM and Zhang T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes by vitrification. *CryoLetters*, 31(3): 230-238 (2010)
- Jin, B. & Mazur, P. High survival of mouse oocytes/embryos after vitrification without permeating cryoprotectants followed by ultra-rapid warming with an IR laser pulse. *Sci. Rep.* 5, 9271; DOI:10.1038/srep09271 (2015).
- Liu Y, Blackburn H, Taylor SS, Tiersch TR. Development of germplasm repositories to assist conservation of endangered fishes: Examples from small-bodied livebearing fishes. *Theriogenology* 135: 138e151, 2019
- Marques et al. Slow freezing versus vitrification for the cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian tissue, *Scientific Reports*, 9:15353, 2019.

Rivers N, Daly J and Temple-Smith P. New directions in assisted breeding techniques for fish conservation. *Reproduction, Fertility and Development*, 32: 807–821, 2020 <https://doi.org/10.1071/RD19457>

Tsai, S. (2009). Development of cryopreservation techniques for early stage zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. Ph.D. Thesis, University of Bedfordshire, Luton

Jin, B. & Mazur, P. High survival of mouse oocytes/embryos after vitrification without permeating cryoprotectants followed by ultra-rapid warming with an IR laser pulse. *Sci. Rep.* 5, 9271; DOI:10.1038/srep09271 (2015).

Zampolla T, Spikings E, Srirangarajah S, Rawson DM and Zhang T. Impact of cryoprotectants and cryopreservation on metabolic activity and cytoskeleton proteins of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian fragments. *CryoLetters* 32(6): 525-536 (2011).

Zhang J, Tian Y, Li Z, Wu Y, Li Z. Meiling Cheng a, d, Linna Wang a, b, Wenhui Ma e, Jieming Zhai Optimization of vitrification factors for embryo cryopreservation of kelp grouper (*Epinephelus moara*). *Theriogenology*, <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.10.002>

Mohanty S, Wu Y, Chakraborty N, Mohanty P, Ghosh G. Impact of alginate concentration on the viability, cryostorage, and angiogenic activity of encapsulated fibroblasts. *Materials Science and Engineering C* 65 (2016) 269–277

Lopes TS, Sanches EA, Caneppele D, Silveira MM, Romagosa E. Chilling sensitivity of *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae) oocytes in different cryoprotectants. *Veterinary and Animal Science* 7 (2019) 100046

Zhang T, Isayeva A, Adams SL & Rawson DM (2005) Studies on membrane permeability of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes in the presence of different cryoprotectants. *Cryobiology* 50, 285–293

Financial support: CNPq, CAPES, FAPERGS

CAPÍTULO III

ARTIGO II

Vitrification of ovarian tissue without internal cryoprotectants: a safer alternative for fish female gametes preservation

Formatado para submissão de acordo com o escopo da Cryobiology, IF: 2.283 ISSN: 0011-2240.

Vitrification of ovarian tissue without internal cryoprotectants: a safer alternative for fish female gametes preservation^[ACNV7]

Itamar Cossina Gomes^a; Andrea Giannotti Galuppo^{a*}; Rômulo Batista Rodrigues^a; Thales L Flores Machado^a; Gabriela Thais Pinheiro^a; Jhony Lisbôa Benato^a; Thaiza Rodrigues de Freitas^a; Jéssica Francielle Teixeira Chaves Petry^b; Douglas Gamba^b; Danilo P Streit Jr^{a**}

^aAnimal Science Program, Aquaculture Laboratory-AQUAM, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 7712, Porto Alegre - RS, Brasil, CEP 91540-000; ^b Biochemistry Department, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre - RS, Brasil, CEP 90650-001

itamar_cossina@yahoo.com.br; andreagalupo@yahoo.com.br;
rrodrigues1903@gmail.com; thalesflores@hotmail.com;
gthaispinheiro@icloud.com; jhonybenato@hotmail.com;
thaiza.rfreitas@gmail.com; jessica.ftcp@gmail.com; douglas.gamba@ufrgs.br;
danilo.streit@ufrgs.br

*Corresponding author at all stages of refereeing and publication: Andrea Giannotti Galuppo – andreagalupo@yahoo.com.br
Departamento de Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Campus do Vale, Av. Bento Gonçalves, 7712, bairro Agronomia, Porto Alegre - RS, Brasil, CEP 91540-000

**Corresponding author post-publication: danilo.streit@ufrgs.br
Danilo Pedro Streit Junior, Departamento de Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Campus do Vale, Av. Bento Gonçalves, 7712, bairro Agronomia, Porto Alegre - RS, Brasil, CEP 91540-000

Declarations of interest: none

Abstract

The aim of the study was to develop a vitrification protocol for fish ovarian tissue using sodium alginate as a natural, healthier option. The experiments herein compared the viability of zebrafish ovarian tissue fragments exposed to three vitrification solutions (VS). VS1 (control) was composed of 5.5 M dimethyl sulfoxide (Me₂SO) with 0.5 M sucrose. VS2 was composed of 5.5 M Me₂SO with 2% sodium alginate, and VS3 was composed of only 2% sodium alginate. Each VS was submitted to three different equilibrium times (1, 7, or 15 min) with their respective equilibrium solutions. The oocyte membrane integrity was analyzed using a trypan blue test, and mitochondrial metabolism was evaluated using a thiazolyl blue tetrazolium bromide assay (MTT assay). The trypan blue tests indicated that it was possible to preserve between 40 and 60% of oocytes, even when the cells were preserved with alginate only ($P=0.2667$). The MTT assay results revealed a relationship between the cells' mitochondrial activity and the equilibrium time ($P=0.0244$) as well as the vitrification solution identity ($P=0.0030$). The application of trypan blue and MTT assays made it possible to understand that alginate is a healthy alternative cryoprotectant for the preservation of fish reproductive tissues. However, further studies will be necessary in order to optimize the protocol to achieve even higher levels of cell viability at all stages of maturation. Cryopreservation methodologies utilizing lower levels of cryoprotectants, or that are cryoprotectant-free, will benefit not only the preservation of animal gametes but may find useful applications in other areas.

Key words: sodium alginate, zebrafish, oocytes, cryopreservation

Introduction

The zebrafish (*Danio rerio*) is one of the most important fish species since it is widely used as an experimental model for animal and medical studies. Zebrafish research lines are usually stored as live animals in resource centers across the world. However, housing live animals requires large spatial commitments, large amounts of food, environmental maintenance, personnel, and carries the risk of diseases that could end up infecting the entire animal research population. With this in mind, it is also important to develop methods for the preservation of cellular and genetic resources. Cryopreservation is a promising approach that directly addresses these challenges [1]. In both veterinary and human medicine, cryopreservation procedures are routine. Since proving itself an effective approach to preserving cells, cryopreservation strategies have been used to freeze millions of mice and cattle embryos, as well as hundreds of thousands of human embryos [2, 3]. Despite the successful cryopreservation of gametes and embryos from several mammalian species, similar results have yet to be achieved with cells derived from fish [3, 4]. An efficient protocol for cryopreserving oocytes and embryos of aquatic species remains absent [1, 4]. The two most commonly used cryopreservation methods, slow freezing and vitrification, have been tested without success.

Cryopreservation methods are based on the principle of protecting cells from damage related to intracellular ice crystal formation at low temperatures [4]. Ice formation is associated with excessive cell dehydration, while ice crystal formation also alters cellular solute concentrations, ultimately leading to cell death [5]. Vitrification procedures utilize highly concentrated cryoprotective solutions to inhibit the formation of ice crystal lattices during the transition from a liquid to amorphous vitreous state, thus promoting cell viability [1]. However, the use of high cryoprotectant concentrations may be toxic to cells, as they are often alcohols or other organic solvents [6, 7]. In order to mitigate the toxic effects of cryoprotectants, the addition of sugars, polymers, or non-permeable cryoprotectants has been suggested [5, 8].

Although the application of traditional cryopreservation protocols to fish oocytes and embryos suffers from these intrinsic limitations, other factors also

inhibit its utility. These factors include the following: the high structural complexity of oocytes and embryos, their large size, a high yolk content, a low membrane permeability, and a high chilling sensitivity [9]. To minimize the negative effects of these biological factors during cryopreservation, it is necessary to optimize cryopreservation protocols for cellular viability, stability, and functionality after thawing [8]. Vitrification protocols have demonstrated better results than slow freezing protocols with regards to the cryopreservation of zebrafish ovarian tissue [1]. Despite the cellular damage related to the use of cryoprotectants, only changes in cryoprotectant combination and concentration have been studied. Therefore, we decided to improve the vitrification protocol for fish ovarian tissue preservation.

We believe that, if well controlled, vitrification procedures will result in improved cell viability. To corroborate that idea, we decided to test if it was possible to cryopreserve cells without the use of internal cryoprotectants, such as methanol or dimethylsulfoxide. Sodium alginate is a natural polysaccharide extracted from brown algae with unique physicochemical properties. Alginate has a three-dimensional gel forming capacity, a high viscosity in aqueous solutions, can rapidly absorb water, and has been shown to enhance cell resistance to osmotic swelling [7]. Sodium alginate has already been successfully utilized for the preservation of somatic and stem cells, with those results indicating high levels of cellular viability, membrane integrity, and metabolic activity [7, 10]. Therefore, this study sought to develop a vitrification protocol for fish ovarian tissue using sodium alginate as a natural alternative to internal cryoprotectants.

Materials and Methods

The study herein was conducted in accordance with the National Council for Control and Animal Experimentation and was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul. Project number: 37996.

Animals

A total of thirty animals were used in this study. The zebrafish were maintained in filtered and aerated 40 L aquariums at 27°C under a 14/10 h

(light/dark) photoperiod. Fish were fed four times a day with TetraMin® dry flake fish food (Tetra, Germany).

Ovarian fragment collection

Animals were euthanized with a lethal dose of tricaine methane sulfonate (0.6 mg/mL) for 5 min and then decapitated. The thirty female zebrafish used in the study had an average total length of 4.1814 cm (\pm 0.2693 cm), and an average weight of 0.5782 g (\pm 0.1693 g). The gonads selected for cryopreservation protocols weighted 0.0611 g (\pm 0.0401 g). The ovaries were collected and washed in 90% Leibovitz L-15 medium (pH 9.0) supplemented with L-glutamine. The fragmentation was performed under a Nikon SMZ 745 stereoscopic microscope with 4X magnification, and produced fragments that measured about 2 x 2 mm. Immediately after fragmentation, samples were randomly distributed into the experimental groups described in the following section.

Experimental design

The experimental design employed herein was based on that of Marques *et al.* (2019) but with some modifications [1]. We focus on two different vitrification parameters in order to minimize deleterious effects. The first parameter tested was the time period allowing for the equilibrium solution to enter cells before vitrification. With regards to this parameter, we sought to identify the duration at which the process transitions from being beneficial to cryopreservation to becoming toxic to the cells. The second parameter evaluated addresses the high concentrations of cryoprotectant used in vitrification solutions. We decided to test if it was possible to cryopreserve cells without the use of internal cryoprotectants, such as dimethylsulfoxide (Me₂SO). Me₂SO was selected for this study due to its reputation as a highly effective cryoprotective agent.

Zebrafish ovarian tissue fragment vitrification was studied using three different vitrification solutions and three different equilibrium times. Prior to vitrification solution (VS) exposure, tissues fragments were immersed in their respective equilibrium solutions (ES). The vitrification solutions tested were: 5.5 mol L⁻¹ Me₂SO with 0.5 mol L⁻¹ sucrose (control – VS1), 5.5 mol L⁻¹ Me₂SO with 2% sodium alginate (VS2) (Sigma-Aldrich-Merck, W201502) and 2 % sodium

alginate alone (VS3). All vitrification reagents were solubilized in an L-15 medium (90%, pH 9). During the vitrification procedure, each tissue sample was first incubated in an equilibrium solution (ES) and then exposed to its respective VS. For VS1 and VS2, the ES used was composed of 2.75 mol L⁻¹ Me₂SO in 90% L-15 (ES1). ES2 was composed of L-15 (90%, pH 9) and was combined with VS3. The experimental groups were ES1/VS1, ES1/VS2 and ES2/VS3. Each group was studied using three equilibration times: 1, 7, and 15 min at 4° C. This resulted in nine experimental groups in total (Table 1).

Vitrification solutions and protocol

Vitrification was performed according to the following process. Tissue fragments were individually placed into a cryotube. The fragments were then covered with the appropriate ES (300 µL at 4°C) and incubated for its respective time. During the equilibration period, samples were kept at 4°C. After 1, 7, or 15 min, the ES was removed and the fragment was immersed in the appropriate VS (300 µL at 4°C). All experimental groups remained in the vitrification solution for 90 seconds [1]. Following this, the VS was removed and the sample was immediately immersed in liquid nitrogen. The table below illustrates the equilibrium solutions with their respective vitrification solutions (Table 1).

Table 1: Equilibration times used for each equilibrium solution (ES) prior to exposure to a vitrification solution (VS).

Equilibration time	Equilibrium solution*	Vitrification solution
1 min	ES1	VS1 (control)
		VS2
	ES2	VS3
7 min	ES1	VS1 (control)
		VS2
	ES2	VS3
15 min	ES1	VS1 (control)
		VS2
	ES2	VS3

Warming

The samples were removed from liquid nitrogen and placed into a water bath at 37°C for 1 min. A 1 mol L⁻¹ sucrose solution was added to each cryovial. After this, samples were removed from the water bath, and the initial sucrose solution was replaced with a 0.5 mol L⁻¹ sucrose solution for 3 min. After this time had passed, this sucrose solution was itself substituted for a 0.25 mol L⁻¹ sucrose solution for 5 min at room temperature [1]. Samples were then ready for subsequent testing.

Membrane integrity evaluation – trypan blue solubilization test

Membrane integrity was evaluated using a trypan blue test. This technique is based on the principle that live cells with structurally intact membranes exclude the dye and it will not be stained; while dead cells with disintegrating membranes cannot exclude the dye and will be stained [11]. We identified a high degree of variation in staining patterns depending on the base solutions used for trypan blue dilution. This led us to suspect that different solvents might damage cell membranes and thus produce a false indication of cell death. To investigate this, four solutions were prepared with 0.4% of trypan blue. The solvents used were distilled water, 90% Leibovitz medium, PBS, and 0.9% saline. Fresh fragments of ovarian tissue from zebrafish were then evaluated using each dilution. The optimal solution would then be selected for membrane integrity evaluation of vitrified fragments. Ovaries were gently collected via dissection and partitioned into 2x2 mm fragments. The fragments were randomly divided into the different solutions described above. Ovarian fragments were kept in the trypan blue solutions for 3 min at room temperature and then washed 3 times with L-15. The fragments were then evaluated using optical microscopy at 10 X magnification. Oocytes with intact membranes remained uncolored while oocytes with damaged membranes were stained blue. For each slide more than 200 oocytes were evaluated. Since we choose to work with fresh tissue fragments, we expected a higher viability rate to correlate to the best trypan blue solution.

Membrane integrity evaluation – vitrified tissue

Immediately after warming, the vitrified ovarian fragments were incubated in 0.4% trypan blue in 90% L-15 for 3 min at room temperature. The fragments were then washed three times with 90% L-15 medium. The fragments were observed using a light microscope with 4X magnification and photographed (Cosimmedical – ANATOMIC - TA-0124-B) for further evaluation. Unstained oocytes were classified as having intact membranes, while stained oocytes were classified as having disrupted membranes. For each vitrification sample, 600 oocytes were analyzed per replicate. All analyses were performed in triplicate.

Mitochondrial activity assay with modifications and pre-test

The thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay is a test typically used with a defined number of mammalian cells. Since we work with tissue fragments composed of an undefined number of non-mammalian cells, we decided to develop a standardized MTT assay for zebrafish ovarian tissue cells. Preliminary tests were performed in order to demonstrate a linear relationship between fragment size and the number of component cells. Higher cell numbers would be identified with increased absorbance readings. For this purpose, five groups of fresh ovarian tissue fragments with various weights were utilized for MTT assays. The output absorbance values were then statistically analyzed. In order to normalize the recorded mitochondrial activities to the size of the tissue fragments, each vitrified tissue fragment was carefully weighed prior to the MTT assay but after the rewarming process. Furthermore, the standard MTT assay protocol was modified in order to account for fish cell metabolism, as described in further detail below.

MTT assays are normally used to assess mitochondrial activity in mammalian cells at 37°C. MTT assays are based on the reduction of MTT to formazan crystals by the mitochondrial succinyl dehydrogenase enzyme, which is only active in living cells. In the adapted protocol for zebrafish, ovarian tissue fragments were incubated with MTT (5 mg/mL) immediately after warming for 2 h at 28 °C and protected from light. The MTT solution (400 µL) was then removed, and 400 µL of dimethyl sulfoxide was added to dissolve the formed crystals. Next, the absorbance of the resulting solution at 570 nm was quantified using a

SpectraMax® 250 Microplate Spectrophotometer. Each sample was analyzed in triplicate [12].

For preliminary testing, five groups of fresh ovarian tissue fragments with various weights were submitted to the modified MTT assay. The experimental groups were: 0.05 g, 0.025 g, 0.0125 g, 0.006 g, and 0.003 g.

Statistical analyses

Trypan blue solubilization data were analyzed with Kolmogorov-Smirnov and Levene normality and homogeneity tests, respectively. As the data were found to be non-parametric, they were analyzed with a Kruskal-Wallis test and a significance threshold of $\alpha = 0.05$.

Preliminary MTT data were also subjected to homogeneity and normality tests. As they do not meet the statistical assumptions for performing ANOVA (the data are not parametric), the data were log-transformed in order to meet these assumptions. The data were then analyzed with Tukey's test or a Kruskal-Wallis non-parametric test, followed by Dunn's test.

To compare the different vitrification solutions and the equilibration times, a two-way ANOVA (Two-Way ANOVA) was used considering primary effects as well as interaction terms. When a significant effect was observed for one of the factors, Tukey's means comparison test was applied. The data are presented as the mean \pm standard deviation (SD).

Results

The trypan blue solubilization tests were analyzed, and it was determined that all solutions (ES1, ES2, ES3 and ES4) could be used for membrane integrity evaluation. The statistical analysis showed no significant difference between the membrane integrities of groups analyzed with different trypan blue solvents (Figure 1). Considering this, we choose to work with the PBS solution since it is the standard medium for zebrafish ovarian tissue manipulation.

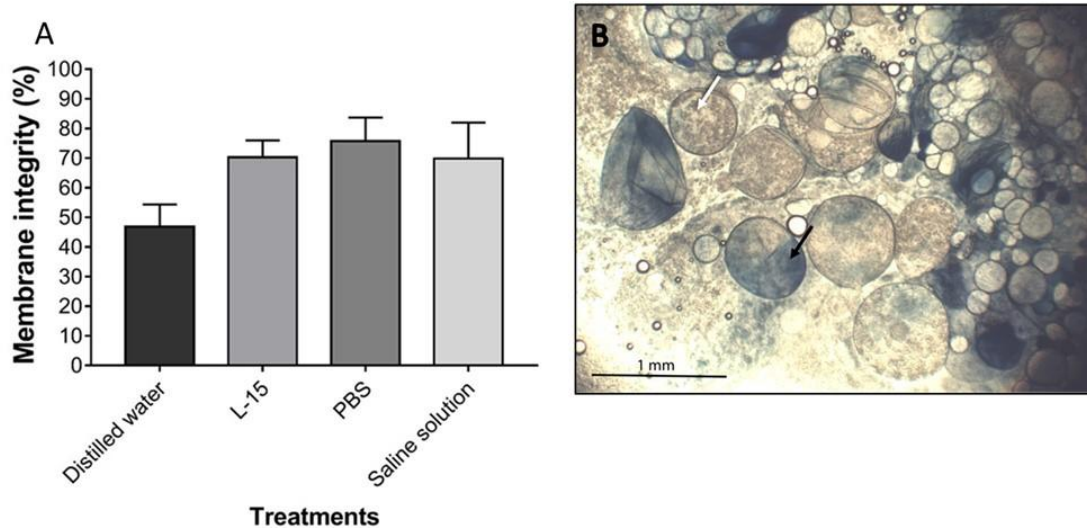


Figure 1. Viability rates for oocytes with different trypan blue solutions (A). There was no significant difference between treatments ($p = 0.2667$). Image B shows how the analysis was conducted, with the white arrow showing a live (unstained) oocyte and the black arrow pointing to a dead (stained blue) oocyte.

After warming, all experimental groups were subjected to trypan blue testing (in PBS) in order to evaluate membrane integrity. Blue cells were considered damaged and the white cells were considered intact (Figure 2 VS1, VS2 and VS3). Although no statistical difference was observed when comparing the vitrification solutions and equilibration times, numerically some stages seemed to better preserve membrane integrity than others. The data show it is possible to preserve 30% – 40% of cells in stage I and II of maturation regardless of the vitrification solution or equilibration time used. This is an important finding as one of the vitrification solutions was only composed of L-15 medium with 2% sodium alginate, thus lacking any internal cryoprotectant (Figure 3 A-B). The best equilibration time for oocytes in stage III was 1 min for the alginate only group (Figure 3 C). For stage III cells vitrified with dimethylsulfoxide and sucrose or dimethylsulfoxide and alginate, there was no difference between the equilibration times. However, oocytes in stages IV and V demonstrated less than 5% membrane integrity for all experimental groups (Figure 3 D-E). Considering the data from all the cells with intact membranes, it appears possible to preserve between 40 and 60% (Figure 3 F). Again, it is important to note that the alginate only group showed no significant difference compared to the other groups. This

demonstrates that it is possible to successfully vitrify ovarian tissue fragments without internal cryoprotectants.

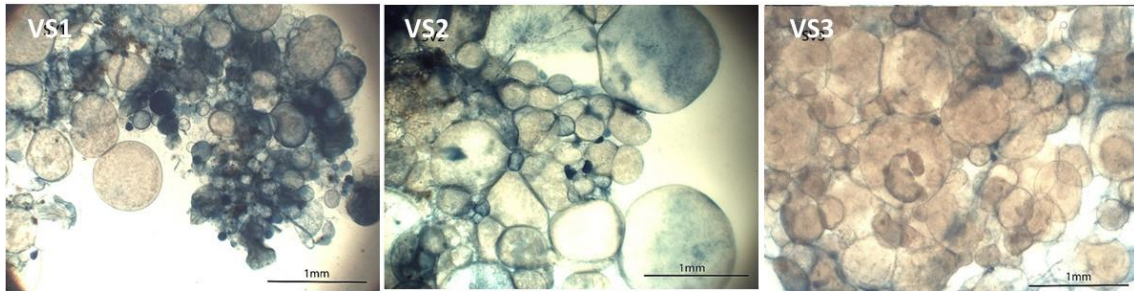


Figure 2: Ovarian tissue fragments stained with trypan blue, blue cells were considered damaged and white cells considered intact. (VS1 – dimethyl sulfoxide/sucrose, VS2 – dimethyl sulfoxide/alginate and VS3 - alginate) (40X).

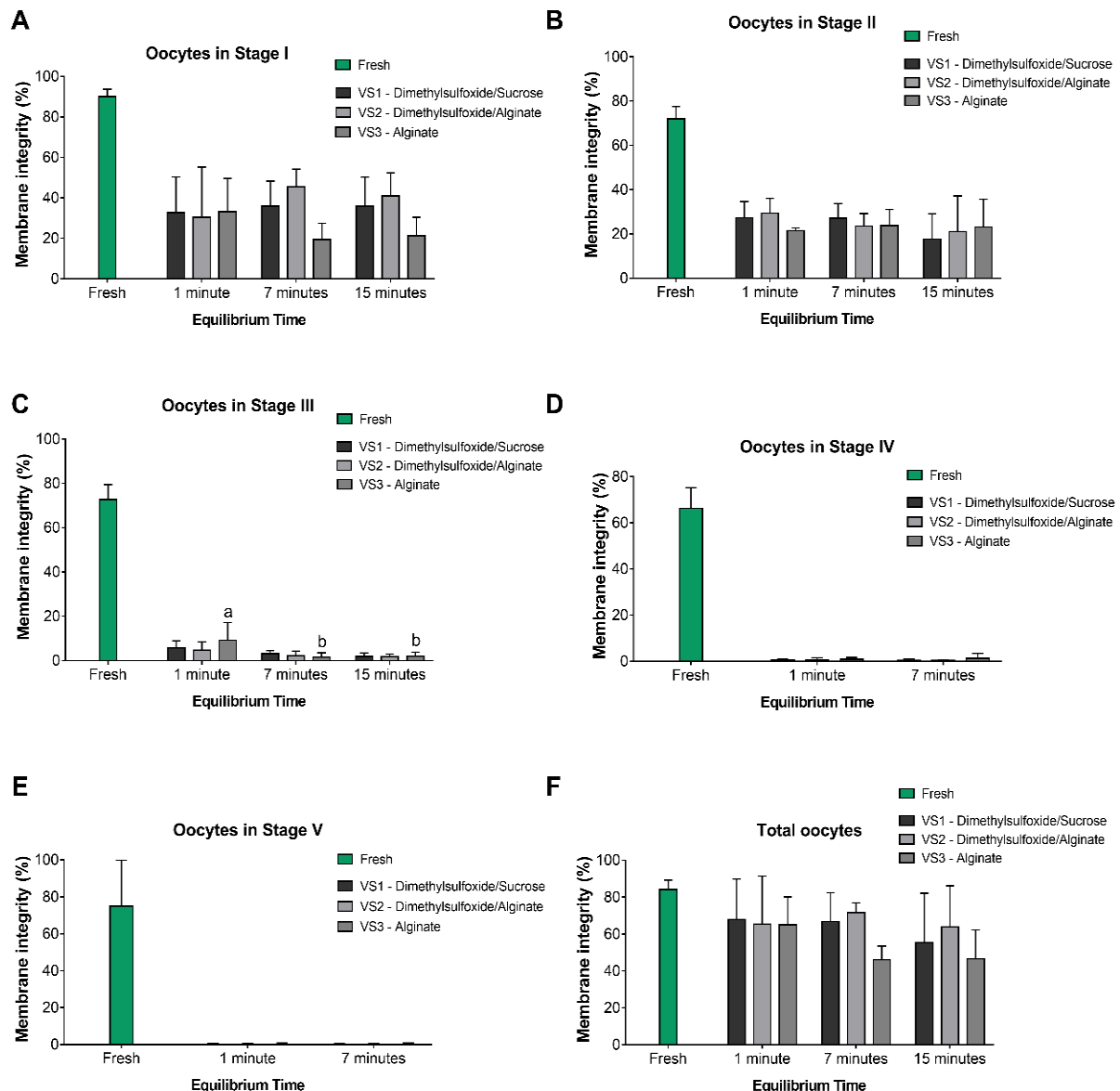


Figure 3. Evaluation of membrane integrity. Figures A, B, D, E and F: no significant difference is observed when evaluating the effects of cryoprotective solutions, equilibration time, and two-way interactions; Figure 2C: significant differences are observed when considering equilibration times with stage III oocytes ($p = 0.0164$).

The MTT assay data illustrates that larger tissue fragment sizes correspond to higher levels of mitochondrial activity ($p < 0.0001$). This demonstrates that they were composed of a greater number of cells. We observed that for fragments from the 0.05 g and the 0.006 g groups, it was possible to distinguish the differences among the cell numbers. However, with

tissue fragments under 0.006 g no relationship to cell number could be drawn. That said, all the vitrified tissue fragments weighed between 0.06 g and 0.006 g. Thus, it was possible to use the modified MTT assay to measure mitochondrial activity in the vitrified fragments of zebrafish ovarian tissue (Figure 4A).

The evaluation of cryopreserved fragments revealed that there was a relationship between the cells' mitochondrial activity and the equilibration time ($p < 0.005$) as well as the vitrification solution used ($p < 0.05$). There was no significant effect due to the interaction between these factors ($p > 0.05$). Furthermore, the vitrification solution did not have a significant effect within each equilibration time group ($p > 0.05$). When evaluating the mitochondrial activity of the ovarian tissue fragments after warming and comparing the groups of each vitrification solution individually submitted to the different equilibration times, we observed that there was no significant difference between the absorbance values recorded for the SV1 and SV3 groups among the considered equilibration times ($p > 0.05$) (Fig 3B). However, when comparing each vitrification solution by equilibration time, we observed that SV2 presented a better result when compared to SV3 with an equilibration time of 1 minute (Fig 4B). When the three vitrification solutions were subjected to different equilibration times, only the treatment of SV2 demonstrated a difference (Figures 4 C-E). Equilibrating SV2 for one minute produced greater mitochondrial activity than equilibrating for 15 minutes (Figure 4D).

Therefore, equilibration times of 1, 7, or 15 min at 4 ° C do not directly alter the post-cryopreservation mitochondrial activity of ovarian tissue fragments. However, it is important to note that all equilibrations were performed at low temperatures, and not at room temperature as most protocols describe. At room temperature, the cytotoxic effects of dimethyl sulfoxide are enhanced. This leads to cell damage and cell death [13]. On the other hand, the tissue fragments preserved with SV2 (dimethylsulfoxide/alginate) demonstrated higher absorbance values for an equilibration time of 1 minute compared to 15 min.

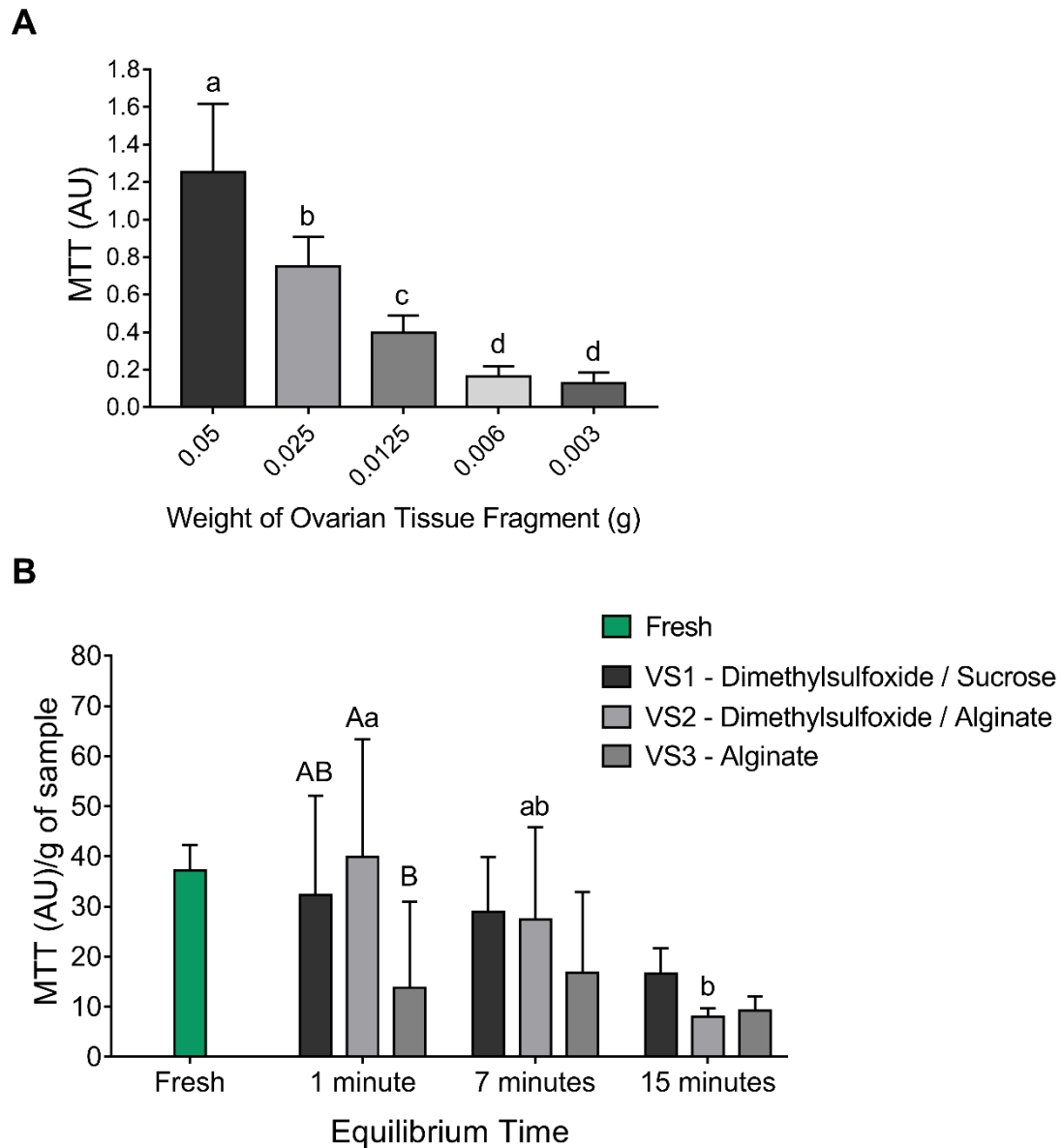


Figure 4. The first panel (A) shows that larger fragments will produce higher levels of mitochondrial activity ($p < 0.0001$), thus demonstrating that these fragments are composed of a greater number of cells. Different lower-case letters indicate a difference among the weight groups. The second panel (B) shows the effect of the vitrification solutions ($p = 0.0244$), equilibration time ($p = 0.0030$), and two way interaction ($p = 0.2877$). Different capital letters indicate a difference between the vitrification solutions within each equilibration time.

Discussion

It has been suggested that ovarian follicles in immature stages (I and II) have characteristics that make them less susceptible to cryoinjury than follicles in advanced maturation stages (III, IV and V) [14]. Follicles in stage I and II are smaller in size, resulting in a higher surface area to volume ratio. A high surface area to volume ratio facilitates better penetration of water and solutes when compared to larger cells (low surface to volume ratio). Thus, cells with a high surface area to volume ratio could have an increased chance of survival during cryopreservation [1]. However, our data raises new questions to this belief. The idea of improved solute penetration in smaller cells explains the better cryopreservation results for immature oocytes when internal cryoprotectants were used. However, we observed no differences in the trypan blue test results across all the experimental groups when using stage I and II oocytes. This demonstrates that even cells preserved without Me₂SO, in other words with alginate only, had similar levels of membrane integrity as the groups with it (Figure 2 and 3).

We believe that other biological mechanisms may be at work here, or perhaps less damage was done to the cells due to the absence of internal cryoprotectants. The vitrification process is based on the inhibition of ice crystal formation due to the completely glassy state of a sample. The formation of the glassy state protects the cell from possible osmotic imbalances, since no extracellular crystallization nor cell injuries from intracellular ice formation can occur [15]. It is important to achieve the glass transition temperature before crystallization starts in order to avoid cellular damage due to osmotic imbalances [15]. One way to achieve this is by using highly viscous media, such as our alginate solution. We believe that this increases the glass transition temperature and promote ultra-fast cooling rates during vitrification.

This idea was corroborated when we analyzed samples from stages IV and V using the trypan blue test (Figure 3 D and E). We observed a decrease in the viability rates from around 50% in stages I and II to 1% to 10% in stages III to V. This is likely due to the biological characteristics of maturing oocytes that impede the exchange of solutes across the cell membrane [14]. We find it interesting that at stage IV and V the groups vitrified with VS3 (alginate only) seem to present higher levels of oocyte viability than the groups vitrified with two

other solutions using samples from the same stages (Figure 3 C-E). This observation raises questions about the cytotoxicity of Me₂SO and other internal cryoprotectants while demonstrating that alginate can be a healthy alternative for ovarian tissue vitrification.

Me₂SO cytotoxicity is dependent on the concentration and incubation time. Another important parameter with regards to Me₂SO as an internal cryoprotectant is the exposure temperature [13]. The main damage done due to Me₂SO manifests in the disorganization of the actin cytoskeleton [6]. In a previous study, it was demonstrated that mouse oocytes exposed to 1.0 M and 1.5 M of Me₂SO for 30 min at room temperature exhibited abnormal cortical actin [6]. However, that negative effect could be reduced when the samples was kept at 4°C [6]. While we acknowledge the number of viable stage IV and V oocytes was low, we cannot ignore the fact that a considerable number of cells was able to survive the vitrification/warming process with the presence of alginate only (SV3) and without any internal cryoprotectants.

MTT assays are usually performed with cell suspensions of a defined cellular concentration. However, to suit the purposes of this study, we proposed an adaptation of the traditional MTT assay protocol. We did not want to enzymatically treat the tissue since the revived tissue fragments were fragile. Additional enzymatic processing could have worsened existing cellular damage, leading to reduced cellular viability rates. Being able to perform MTT assays was critical since it enabled the collection of functional physiological data which could complement the anatomical data provided by the trypan blue test. Furthermore, mitochondrial metabolism is important since it is related to the preservation of the cellular cytoskeleton after the vitrification/warming process. Changes in F-actin organization following a decrease in cellular ATP levels in cryopreserved cells are related to a loss in membrane integrity [6, 15]. A loss in membrane and cytoskeletal integrity is associated with compromised cellular functions such as adhesion, migration and proliferation [15].

The MTT results show that the use of alginate as a cryoprotectant is enhanced by dimethyl sulfoxide (Figure 4B). We found that VS1 does not result in statistically different metabolic activity when compared to data obtained with the other two solutions. This is extremely important since vitrification solutions containing dimethyl sulfoxide and sucrose are very common in existing

vitrification protocols [1, 7]. Furthermore, this demonstrates the potential of alginate as an external cryoprotectant for zebrafish ovarian tissue as there was no significant difference in mitochondrial activity between VS3 and the other groups (Figure 4B).

Even more importantly, this result demonstrates the possibility of cryopreserving fragments of ovarian tissue from fish without the use of internal cryoprotectants (Figure 4B). The MTT data, when taken together with the trypan blue data, provides for a more complete understanding of cell viability after warming. It was observed that the cells preserved with alginate only, those without any internal cryoprotectants, presented similar results compared with the other two groups (Figure 4B). [ACNV8] This could support the idea that internal cryoprotectants can damage cells despite having cryoprotective characteristics.

Another point to be discussed is that the cryopreservation of cells in suspension is a well-defined technique with good viability results following warming. However, the application of cryopreservation techniques to complex cellular aggregates or multicellular tissues with a three-dimensional structure remains challenging [16]. We choose to work with ovarian tissue fragments despite these challenges. The major problem in the application of these techniques is likely related to the non-uniform distribution of the cryoprotective solution throughout the tissue fragment structure [8]. However, we were able to preserve the viability of more than 50% of the oocytes evaluated, considering the data from the trypan blue and MTT assays. It is likely that this is due to the fragment size used.

The size of the fragment was an important parameter that prevented equilibration time from interfering significantly with cellular viability. It is important to consider that the size of the tissue fragments is even more relevant than the equilibration time, as this plays a large role in determining the time needed for the equilibration solution to uniformly distribute throughout the fragment. In some trypan blue samples, it was possible to identify a group of cells with intact membranes within the center of the tissue fragment. If the fragment is large, a higher equilibration time will be necessary. Longer durations of exposure to the equilibration solution experienced by the surface cells probably resulted in toxicity, while the cells at the center only experienced a fraction of the exposure [8].

In this study, we introduce the possibility of cryopreserving fragments of fish ovarian tissue using a vitrification process without the use of internal cryoprotectants. We propose the use of sodium alginate, which is a natural molecule derived from algae, as an external cryoprotectant during vitrification procedures. Sodium alginate has demonstrated great potential but further optimization of cryopreservation protocols using this molecule are needed. We believe that alginate can achieve a glassy state during vitrification, and thus is able to minimize osmotic damage. We were able to show that the use of alginate with L-15 as a solvent allowed for the preservation of zebrafish oocytes in all stages of development, although oocytes from stages I and II gave better results.

The methodology of utilizing data from trypan blue and MTT assays together made it possible to understand that alginate is a healthy alternative cryoprotectant for the preservation of fish oocytes. However, further studies will be necessary in order to optimize the protocol in order to achieve higher levels of cell viability across all stages of oocyte development. The development of cryopreservation methodologies utilizing lower levels of cryoprotectants, or being completely cryoprotectant-free, will benefit not only the preservation of animal gametes but will also find applications in human reproduction, regenerative medicine, clinical medicine, and pharmacology [8]. We conclude that it was possible to apply an alginate-based vitrification protocol to fragments of zebrafish ovarian tissues without loss of quality in relation to the traditional cryoprotectant Me₂SO.

Acknowledgments: This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Fapergs).

Acknowledgments to Professor Itabajara S. Vaz Jr. from the Immunology Laboratory of the Biotechnology Center of Veterinary Medicine Faculty of Rio Grande do Sul Federal University for kindly providing the spectrophotometer used for MTT assays.

References

- [1] L.S. Marques, A.A.N. Fossati, R.B. Rodrigues, H.T. Da Rosa, A.P. Izaguirry, J.B. Ramalho, J.C.F. Moreira, F.W. Santos, T. Zhang, D.P. Streit Jr., Slow freezing versus vitrification for the cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian tissue, *Sci. Rep.*, 9 (2019) 15353. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51696-7>.
- [2] S.P. Leibo, J.M. Sztejn, Cryopreservation of mammalian embryos: Derivation of a method, *Cryobiology*, 86 (2019) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol>.
- [3] V. Robles, D. Valcarce, M.F. Riesco, The Use of Antifreeze Proteins in the Cryopreservation of Gametes and Embryos, *Biomolecules*, 9 (2019) 181. <https://doi.org/10.3390/biom9050181>.
- [4] T.S. Lopes, E.A. Sanches, D. Caneppele, M.M. Silveira, E. Romagos, Chilling sensitivity of *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae) oocytes in different cryoprotectants, *Vet. Animal. Sci.*, 7 (2019) 100046. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2019.100046>.
- [5] D.E. Pegg, The role of vitrification techniques of cryopreservation in reproductive medicine, 8 (2005) 231-239. <https://doi.org/10.1080/14647270500054803>
- [6] T. Zampolla, E. Spikings, D. Rawson, T. Zhang, Cytoskeleton proteins F-actin and tubulin distribution and interaction with mitochondria in the granulosa cells surrounding stage III zebrafish (*Danio rerio*) oocytes, *Theriogenology*, 76 (2011) 1110-1119. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.018>.
- [7] G. Liu, S. Li, H. Yuan, M. Hao, Y.Z. Wurihan, J. Zhao, Y. Ma, Y. Dai, Effect of sodium alginate on mouse ovary vitrification, *Theriogenology*, 113 (2018) 78e84. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.02.006>
- [8] S. Mohanty, Y. Wu, N. Chakraborty, P. Mohanty, G. Ghosh, Impact of alginate concentration on the viability, cryostorage, and angiogenic activity of encapsulated fibroblasts, *Mater. Sci. Eng.C*, 65 (2016) 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.04.055>.

- [9] T. Zhang, D.M. Rawson, Studies on chilling sensitivity of zebrafish 441 (*Brachydanio rerio*) embryos. *Cryobiology*, 32 (1995) 239-246. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.05.005>.
- [10] O. Gryshkov, N. Hofmann, L. Lauterboeck, D. Pogozhykh, T. Mueller, B. Glasmacher, Multipotent stromal cells derived from common marmoset *Callithrix jacchus* within alginate 3D environment, *Cryobiology*, 71 (2015) 103-111. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.05.001>.
- [11] L. Björndahl, I.S. Derlund, S. Johansson, M. Mohammadieh, M.R. Pourian, U. Kvist, Why the WHO Recommendations Andrology for Eosin-Nigrosin Staining Techniques for Human Sperm Vitality Assessment Must Change, *J. Androl.*, 25 (2004) 671-678. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02839.x>.
- [12] I.C.Gomes, A.G. Galuppo, R.B. Rodrigues, T.L. Flores, J. Benato, G. Pinheiro, J. Petry, D. Gamba, L.C. Godoy, D.P. Streit Jr, Impact of sodium alginate on the viability of zebrafish oocytes after ovarian tissue vitrification. In: 56th Annual Meeting of the Society for Cryobiology CRYO2019, 2019, San Diego, CA, USA. *Cryo2019*, p. 73, 2019.
- [13] T. Zhang, A. Isayeva, S.L. Adams, D.M. Rawson, Studies on membrane permeability of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes in the presence of different cryoprotectants, ***Cryobiology*** 50 (2005) 285–293. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.02.007>.
- [14] Y. Müllers, I. Meiser, F. Stracke, I. Riemann, F. Lautenschläger, J.C. Neubauer, et al, Quantitative analysis of F-actin alterations in adherent human mesenchymal stem cells: Influence of slow-freezing and vitrification-based cryopreservation, *PLoS ONE*, 14 (2019) e0211382. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211382>.
- [15] B.P. Best. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions, *Rejuvenation Res*, 18 (2015) 422-436. <http://doi.org/10.1089/rej.2014.1656>.
- [16] Y. Li, T. Ma, Bioprocessing of cryopreservation for large-scale banking of human pluripotent stem cells, *BioResearch Open Access*, 1 (2012) 205–214. <https://doi.org/10.1089/biores.2012.0224>.

4. Considerações finais

A criopreservação de gametas femininos é não somente promissora como também necessária para a preservação da biodiversidade das espécies de peixes, e essa biotecnologia é de fundamental importância não apenas para espécies ameaçadas de extinção, como também para aquelas de relevância econômica para o setor produtivo. Neste contexto a vitrificação de oócitos e tecido ovariano tem sido evidenciada uma boa alternativa, tanto pela sua praticidade, baixo custo e relativa eficiência, no entanto ainda há um grande caminho a ser percorrido para determinar protocolos específicos para cada grupo de animais. Neste estudo, pudemos observar as respostas do tecido ovariano de zebrafish quando submetido a diferentes soluções crioprotetoras, diferentes tempos de equilíbrio e ainda um novo agente crioprotetor não permeável. A partir deste estudo foi possível identificar o quão diferentes são os resultados de cada interação. Este fato reforça ainda mais a necessidade de desenvolver estudos e protocolos específicos, dando ênfase para cada grupo estudado. Os componentes de cada etapa do processo de criopreservação devem ser testados, monitorados, avaliados e repetidos, tanto em relação aos crioprotetores, tempos de exposição tanto no equilíbrio quanto na desidratação, curvas de resfriamento e aquecimento e como cada um desses fatores podem interagir.

Quanto a utilização do alginato de sódio como crioprotetor não permeável, este se mostrou promissor, no entanto ainda não se conhece todo o potencial dessa biomolécula como crioprotetor para oócitos e tecidos ovarianos. É importante ressaltar que este trabalho marca o primeiro passo para novos e detalhados estudos, pois mesmo na ausência de outros agentes crioprotetores o alginato de sódio promoveu ação crioprotetora garantindo a estabilidade da integridade das células criopreservadas. E este fato apenas ressalta e gera mais perguntas: “Realmente devemos utilizar agentes crioprotetores que possuem propriedades citotóxicas?”; “É possível evitar processos estressantes às células além das curvas de resfriamento e aquecimento?”, “É realmente necessário utilizar tempos de equilíbrio de 15 minutos?”. É possível que essas perguntas sejam norteadoras para a determinação de novos estudos, os quais talvez um

dia atinjam o objetivo de estabelecer protocolos com o máximo de eficiência em preservar o genoma materno de peixes, e juntamente com estes a criação de bancos de germoplasma que garantam a existência e sobrevivência futura de espécies ameaçadas.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, E. *et al.* The zebrafish as a model system for forebrain GnRH neural development. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 164, n. 2/3, p. 151-160, 2009.
- AL-AZAWI, T. *et al.* Cryopreservation of human oocytes, zygotes, embryos na blastocysts: a comparison study between freezing and ultra rapid (vitrification) methods. **Middle East Fertility Society Journal**, Cairo, v. 18, n. 4, p. 223-232, 2013.
- AMORIM, C. A. *et al.* Vitrification and xenografting of human ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, New York, v. 98, n. 5, p. 1291-1298, 2012.
- ANIL, S.; ZAMPOLLA, T.; ZHANG, T. Development of *in vitro* culture method for zebrafish ovarian tissue fragment. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 63, n. 3, p. 311-312, 2011.
- ARAV, A.; ZVI, R. Do chilling injury and heat stress share the same mechanism of injury in oocytes? **Molecular and Cellular Endocrinology**, Limerick, v. 282, n. 1/2, p. 150-152, 2008.
- AXELORD, H. R.; SCHULTZ, L. P. **A handbook of tropical aquarium fishes**. New York: McGraw-Hill, 1955.
- BELOUS, A. M.; GRISCHENKO, V. I. **Cryobiology**. Kyiv: Naukova Dumka Press, 1994.
- BILLARD, R. *et al.* Sperm physiology and quality. *In*: BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. (ed.). **Broodstock management and egg and larval quality**. Oxford: Blackwell Science, 1995. p. 25-52.
- BILOTTA, J.; SASZIK, S. The zebrafish as a model visual system. **International Journal of Developmental Neuroscience**, Oxford, v. 19, n. 7, p. 621-629, 2001.
- BITTON, R. *et al.* Structure of algal-born phenolic polymeric adhesives. **Macromolecular Bioscience**, Weinheim, v. 6, n. 9, p. 737-746, 2006.
- BLAXTER, J. H. S. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. **Nature**, London, v. 172, p. 1189-1190, 1953.
- BODIN, S. *et al.* Integrin-dependent of lipid rafts with the actin cytoskeleton in activated human platelets. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 118, pt. 4, p. 759-769, 2005.
- BONETTI, A. *et al.* Ultrastructural evaluation of human metaphase ii oocytes after vitrification: closed versus open devices. **Fertility and Sterility**, New York, v. 95, n. 3, p. 929-935, 2011.

BOS-MIKICH, A.; WHITTINGHAM, D. G. Analysis of the chromosome complement of frozen-thawed mouse oocytes after parthenogenetic activation. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 42, n. 2, p. 254-260, 1995.

BRACCINI, I.; GRASSO, R. P.; PEREZ, S. Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: a molecular modeling investigation. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 317, n. 1/4, p. 119-130, 1999.

BRACCINI, I.; PÉREZ, S. Molecular basis of C(2+)-induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. **Biomacromolecules**, Washington, DC, v. 2, n. 4, p. 1089-1096, 2001.

BRYANT, G.; PEREZ, E.; SPUTTEK, A. The influence of hydroxyethyl starch on phospholipid monolayer isotherms. **CryoLetters**, London, v. 15, n. 5, p. 299-308, 1994.

BRYANT, G.; KOSTER, K. L.; WOLFE, J. Membrane behaviour in seeds and other systems at low water content: the various effects of solutes. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 11, n. 1, p. 17-25, 2001.

BUS, A. *et al.* Effects of vitrification on the biability o alginate encapsulated isolated bovine pre-antral follicles. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, Amsterdam, v. 35, n. 7, p. 1187–1199, 2018.

CABRITA, E. *et al.* Effect of different cryoprotectants and vitrification solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). **Cryobiology**, Amsterdam, v. 47, n. 3, p. 204-213, 2003.

CAFFEY, R. H.; TIERSCH, T. R. Cost analysis for integration of sperm cryopreservation into an existing fish hatchery. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 31, n. 1, p. 51-58, 2000.

CAPICCIOTTI, C. J. *et al.* Small molecule ice recrystallization inhibitors enable freezing of human red blood cells with reduced glycerol concentrations. **Scientific Reports**, London, v. 5, [art.] 9692, p. [1-10], 2015.

CAROLSFELD, J. *et al.* Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, London, v. 63, n. 2, p. 472-489, 2003.

CARVALHO, A. A. *et al.* Novel wide-capacity method for vitrification of caprine ovaries: Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 138, n. 3/4, p. 220-227, 2013.

CHRISTENSEN, A. K.; GILLIM, S. W. The correlation of fine structure and function in steroid-secreting cells, with emphasis on those of the gonads. *In*: MCKERNS, K. W. (ed.). **The gonads**. New York: Appleton- Century-Crofts, 1969. p. 415-488.

- CLELLAND, E. S. *et al.* Inhibition of premature oocyte maturation: a role for bone morphogenetic protein 15 in zebrafish ovarian follicles. **Endocrinology**, New York, v. 148, n. 11, p. 5451–5458, 2007.
- CONNOLLY, M. H. *et al.* Temporal dynamics of oocyte growth and vitellogenin gene expression in zebrafish (*Danio rerio*). **Zebrafish**, Larchmont, v. 11, n. 2, p. 107-114, 2014.
- CROWE, J. *et al.* Stabilization of cells during freeze-drying: the trehalose myth, *In*: FULLER, B. J. *et al.* (ed.). **Life in the Frozen State**. Boca Raton: CRC, 2004. p. 582–601.
- DE-SHENG, P.; PHYLLIS, R. S. Zebrafish as a model System to study DNA damage and repair. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 743/744, p. 151-159, 2013.
- DECHO, A. W. Imaging an alginate polymer gel matrix using atomic force microscopy. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 315, n. 3/4, p. 330-333, 1999.
- DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetics, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 208, n. 3/4, p. 191-367, 2002.
- DOBRINSKY, J. R. Cryopreservation of swine embryos: a chilly past with a vitrifying future. **Theriogenology**, Los Altos, v. 56, n. 8, p. 1333-1344, 2001.
- DOMINGUEZ, F. *et al.* Effect of vitrification on human oocytes: a metabolic profiling study. **Fertility and Sterility**, New York, v. 99, n. 2, p. 565-572, 2013.
- DONATI, I. *et al.* New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginate gels. **Biomacromolecules**, Washington, DC, v. 6, n. 2, p. 1031-1040, 2005.
- DONATI, I. *et al.* Effect of elongation of alternating sequences on swelling behavior and large deformation properties of natural alginate gels. **The Journal of Physical Chemistry B**, Washington, DC, v. 113, n. 39, p. 12916-12922, 2009.
- DRAGET, K. I.; SKJÅK-BRAEK, G.; SMIDSRØD, O. Alginate based new materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 21, n. 1/2, p. 47-55, 1997.
- DRAGET, K. I.; SMIDSRØD, O.; SKJÅK-BRÆK, G. Alginate from algae. *In*: STEINBÜCHEL, A.; RHEE, S. K. (ed.). **Polysaccharide and polyamides in the food industry**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. p. 1-30.

DRANOW, D. B.; TUCKER, R. P.; DRAPER, B. W. Germ cells are required to maintain a stable sexual phenotype in adult zebrafish. **Developmental Biology**, San Diego, v. 376, n. 1, p. 43-50, 2013.

DRAPER, B. W.; MCCALLUM, C. M.; MOENS, C. B. Nanos1 is required to maintain oocyte production in adult zebrafish. **Developmental Biology**, San Diego, v. 305, n. 2, p. 589-598, 2007.

EDASHIGE, K. *et al.* Japanese flounder (*Paralichthys olivaeus*) embryos are difficult to cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 53, n. 1, p. 96-106, 2006.

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.

EROGLU, A.; TOTH, T. L.; TONER, M. Alterations of the cytoskeleton and polyploidy induced by cryopreservation of metaphase II mouse oocytes. **Fertility and Sterility**, New York, v. 69, n. 5, p. 944-57, 1998.

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

FATHI, R.; VALOJERDI, M. R.; SALEHNIA, M. Effects of different cryoprotectant combinations on primordial follicle survivability and apoptosis incidence after vitrification of whole rat ovary. **CryoLetters**, London, v. 34, n. 3, p. 228-238, 2013.

FATEHI, R. *et al.* Effect of ovarian tissue vitrification method on mice preantral follicular development and gene expression. **Theriogenology**, Los Altos, v. 81, n. 2, p. 302-308, 2014.

FORNARI, D. C. *et al.* Increasing storage capability of pacu (*Piracatus mesopotamicus*) embryos by chilling: development of a useful methodology for hatcheries management. **CryoLetters**, London, v. 33, n. 2, p. 125-133, 2012.

FULLER, B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. **CryoLetters**, London, v. 25, n. 6, p. 375-388, 2004.

GALE, L. G. *et al.* An investigation of oxidative stress and antioxidant biomarkers during Greenshell mussel (*Perna canaliculus*) oocyte cryopreservation. **Theriogenology**, Los Altos, v. 82, n. 6, p. 779-789, 2014.

GALIGUIS, J. *et al.* Birth of a domestic cat kitten produced by vitrification of lipid polarized in vitro matured oocytes. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 68, n. 3, p. 459-466, 2014.

GODOY, L. C. *et al.* A study on the vitrification of stage III zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 67, n. 3, p. 347-354, 2013.

GUAN, M.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Development of a new method for isolating zebrafish oocytes (*Danio rerio*) from ovary tissue masses.

Theriogenology, Los Altos, v. 69, n. 3, p. 269-275, 2008.

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

GUERIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 175-187, 2001.

GIRAUD, M. N. *et al.* Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. **Human Reproduction**, Oxford, v. 15, n. 10, p. 2160-2164, 2000.

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

GOMES, C. M. *et al.* Influence of vitrification on mouse metaphase II oocyte spindle dynamics and chromatin alignment. **Fertility and Sterility**, New York, v. 90, p. 1396-1404, 2008. Supl. 4.

GRASDALEN, H. High-field, ¹H-n.m.r. spectroscopy of alginate: sequential structure and linkage conformations. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 118, p. 255-260, 1983.

GRANT, G. T. *et al.* Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. **FEBS Letters**, West Sussex, v. 32, n. 1, p. 195-198, 1973.

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

GRYSHKOV, O. *et al.* Multipotent stromal cells derived from common marmoset *Callithrix jacchus* within alginate 3D environment: effect of cryopreservation procedures. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 103-111, 2015.

GÜRLER, H. *et al.* Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species and DNA damage of bovine sperm. **Theriogenology**, Los Altos, v. 86, n. 2, p. 562-571, 2016.

HAGEDORN, M. *et al.* Magnetic resonance microscopy and spectroscopy reveal kinetics of cryoprotectant permeation in a multicompartamental biological system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 93, n. 15, p. 7454-7459, 1996.

HAGEDORN, M.; KLEINHANS, F. Problems and prospects in cryopreservation of fish embryos. *In*: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. (ed.). **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 2000. p. 161-178.

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

HANWELL, M. D. *et al.* Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, London, v. 4, [art.] 17, [p. 1-17], 2012.

HAUG, A.; SMIDSRØD, O. Selectivity of some anionic polymers for divalent metal ions. **Acta Chemica Scandinavica**, Copenhagen, v. 24, p. 843-854, 1970.

HECHT, H.; SREBNIK, S. Structural characterization of sodium alginate and calcium alginate. **Biomacromolecules**, Washington, DC, v. 17, n. 6, p. 2160-2167, 2016.

HISAOKA, K. K.; FIRLIT, C. F. The localization of nucleic acids during oögenesis in the zebrafish. **American Journal of Anatomy**, New York, v. 110, n. 3, p. 203-215, 1962.

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.

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

HYTTEL, P.; VAJTA, G.; CALLESEN, H. Vitrification of bovine oocytes with the open pulled straw method: ultrastructural consequences. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 56, n. 1, p. 80-88, 2000.

INGS, J. S.; VAN DER KRAAK, G. J. Characterization of the mRNA expression of Star and steroidogenic enzymes in zebrafish ovarian follicles. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v. 73, n. 8, p. 943-954, 2006.

ISACHENKO, V. *et al.* Effective method for in vitro culture of cryopreserved human ovarian tissue. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 13, n. 2, p. 228–234, 2006.

ISACHENKO, V. *et al.* Human ovarian tissue vitrification versus conventional freezing: morphological, endocrinological, and molecular biological evaluation. **Reproduction**, Bristol, v. 138, n. 2, p. 319–327, 2009.

ISAYEVA, A.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 49, n. 2, p. 114-122, 2004.

IUCN RED LIST OF THREATENED SPECIES. [Dados obtidos da página]. Cambridge: IUCN Global Species Programme Red List Unit, 2017. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 14 jun. 2017.

JOSEF, E.; ZILBERMAN, M.; BIANCO-PELED, H. Composite alginate hydrogels: an innovative approach for the controlled release of hydrophobic drugs. **Acta Biomaterialia**, Kidlington, v. 6, n. 12, p. 4642–4649, 2010.

KAGAWA, N.; SILBER, S.; KUWAYAMA, M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 18, n. 4, p. 568-577, 2009.

KAROW, A. M. Jr. Cryoprotectants--a new class of drugs. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 21, n. 4, p. 209-223, 1969.

KEROS, V. *et al.* Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. **Human Reproduction**, Oxford, v. 24, n. 7, p. 1670–1683, 2009.

KESSEL, R. G.; ROBERTS, R. L.; TUNG, H. N. Intercellular junctions in the follicular envelope of the teleost, *Brachydanio rerio*. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, Siena, v. 20, n. 2, p. 415-424, 1988.

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

KOPEIKA, J. *et al.* Effect of cryopreservation on mitochondrial DNA of zebrafish (*Danio rerio*) blastomere cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 570, n. 1, p. 49-61, 2005.

KOSTER, K. L. *et al.* Effects of vitrified and nonvitrified sugars on phosphatidylcholine fluid-to-gel phase transitions. **Biophysical Journal**, Cambridge, v. 78, n. 4, p. 1932-1946, 2000.

LAMBERT, J. G. D. Steroidogenesis in the ovary of *Brachydanio rerio* (Teleostei). *In*: GAILLARD, P. J.; BOER, H. H. (ed.). **Comparative endocrinology**. Amsterdam: Elsevier, 1978. p. 65-68.

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

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

LEE, H. J. *et al.* Ultra-rapid vitrification of mouse oocytes in low cryoprotectant concentrations. **Reproductive BioMedicine Online**, Amsterdam, v. 20, n. 2, p. 201-208, 2010.

LI, J. *et al.* A transgenic zebrafish model for monitoring xbp1 splicing and endoplasmic reticulum stress in vivo. **Mechanisms of Development**, Limerick, v. 137, p. 33-44, 2015.

LINHART, O. *et al.* Cryopreservation of European catfish *Silurus glanis* sperm: sperm motility, viability, and hatching success of embryos. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 51, n. 3, p. 20-261, 2005.

LISTER, K. N.; LAMARE, M. D.; BURRITT, D. J. Sea ice protects the embryos of the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri* from oxidative damage due to naturally enhanced levels of UV-B radiation. **Journal of Experimental Biology**, London, v. 213, n. 11, p. 1967-1975, 2010a.

LISTER, K. N.; LAMARE, M. D.; BURRITT, D. J. Oxidative damage in response to natural levels of UV-B radiation in larvae of the tropical sea urchin *Tripneustes gratilla*. **Photochemistry and Photobiology**, Lawrence, v. 86, n. 5, p. 1091–1098, 2010b.

LIU, G. *et al.* Effect of sodium alginate on mouse ovary vitrification. **Theriogenology**, Los Altos, v. 113, p. 78-84, 2018.

LOVELOCK, J. E.; BISHOP, M. W. H. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. **Nature**, London, v. 183, p.1394-1395, 1959.

LOVELOCK, J. E. The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. **The Biochemical Journal**, London, v. 56, n. 2, p. 265-270, 1954.

LOPES, T. S. *et al.* Chilling sensitivity of *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae) oocytes in different cryoprotectants. **Veterinary and Animal Science**, Amsterdam, v. 7, [art.] 100046, 2019.

LUJIC, J. *et al.* First successful vitrification of salmonid ovarian tissue. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 76, p. 154-157, 2017.

LUVONI, G. C. Gamete cryopreservation in the domestic cat. **Theriogenology**, Los Altos, v. 66, n. 1, p. 101–111, 2006.

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

MACKIE, W. *et al.* Aspects of the conformation of polyguluronate in the solid state and in solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 5, n. 6, p. 329-341, 1983.

MALONE, T. E.; HISAOKA, K. K. A histochemical study of the formation of deutoplasmic components in developing oocytes of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. **Journal of Morphology**, Philadelphia, v. 112, p. 61-75, 1963.

- MARQUES, L. S. *et al.* Viability of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles after vitrification in a metal container. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 71, n. 3, p. 367-373, 2015.
- MARQUES, L. S. *et al.* Viability assessment of primary growth oocytes following ovarian tissue vitrification of neotropical teleost pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Cryobiology**, Amsterdam, v. 82, p. 118-123, 2018.
- MARQUES, L. S. *et al.* Slow freezing versus vitrification for the cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian tissue. **Scientific Reports**, London, v. 9, [art.] 15353, 2019.
- MARTÍNEZ-BURGOS M. *et al.* Vitrification versus slow freezing of oocytes: effects on morphologic appearance, meiotic spindle configuration, and DNA damage. **Fertility and Sterility**, New York, v. 95, n. 1, p. 374-377, 2011.
- MARTÍNES-PÁRAMO, S. *et al.* Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. **Theriogenology**, Los Altos, v. 71, n. 4, p. 594-604, 2009.
- MATHUR, P.; GUO, S. Use of zebrafish as a model to understand mechanisms of addiction and complex neurobehavioral phenotypes. **Neurobiology of Disease**, San Diego, v. 40, n. 1, p. 66-72, 2010.
- MAZOOCHI, T. *et al.* Morphologic, ultrastructural, and biochemical identification of apoptosis in vitrified-warmed mouse ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, New York, v. 90, p. 1480-1486, 2008. Supl. 4.
- MAZUR, P.; RALL, W. F.; LEIBO, S. P. Kinetics of water loss and the likelihood the temperature dependence of water permeability. **Cell Biophysics**, Clifton, v. 6, n. 3, p. 197-213, 1984.
- MAZUR, P. Equilibrium, quasi-equilibrium and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. **Cell Biophysics**, Clifton, v. 17, n. 1, p. 53-91, 1990.
- MCKERSIE, B. D.; HOEKSTRA, F. A.; KRIEG, L. C. Differences in the susceptibility of plant membrane lipids to peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1030, n. 1, p. 119-126, 1990.
- MÉNÉZO, Y. *et al.* Freezing cocultured human blastocysts. **Fertility and Sterility**, New York, v. 58, n. 5, p. 977-980, 1992.
- MENKE, A. L. *et al.* Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. **Toxicologic Pathology**, Thousand Oaks, v. 39, n. 5, p. 759-775, 2011.
- MERYMAN, H. T. Cryoprotective agents. **Cryobiology**, San Diego, v. 8, n. 2, p. 173-183, 1971.

- MOHANTY, S. *et al.* Impact of alginate concentration on the viability, cryostorage, and angiogenic activity of encapsulated fibroblasts. **Materials Science and Engineering C**, Amsterdam, v. 65, p. 269-277, 2016.
- MUKAIDA, T; OKA, C. Vitrification of oocytes, embryos and blastocysts. **Best Practice & Research clinical Obstetrics & Gynaecology**, Amsterdam, v. 26, n. 6, p. 789-803, 2012.
- NAKAMURA, S. *et al.* Ovarian germline stem cells in the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). **International Journal of Biological Sciences**, Lake Haven, v. 7, n. 4, p. 403–409, 2011.
- NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. H. **Fishes of the world**. 5th ed. New York: John Wiley, 2016. 752 p.
- OKADA, Y. *et al.* Role of lipid raft components and actin cytoskeleton in fibronectin-binding, surface expression, and de novo synthesis of integrin subunits in PGE₂- or 8-Br-cAMP-stimulated mastocytoma P-815 cells. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 88, n. 3, p. 364-371, 2014.
- PALHARES, P. C. *et al.* Effect of melatonin supplementation to a cytoprotective medium on post-thawed *Brycon orbignyanus* sperm quality preserved during different freezing times. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 96, p. 159-165, 2020.
- PEGG, D. E. The role of vitrification techniques of cryopreservation in reproductive medicine. **Human Fertility: Journal of the British Fertility Society**, Cambridge, v. 8, n. 4, p. 231-239, 2005.
- PERIĆ-HASSLER, L.; HUNENBERGER, P. H. Interaction of alginate single-chain polyguluronate segments with mono- and divalent metal cations: a comparative molecular dynamics study. **Molecular Simulation**, New York, v. 36, n. 10, p. 778-795, 2010.
- PLAZINSKI, W. J. Molecular basis of calcium binding by polyguluronate chains. Revising the egg-box model. **Journal of Computational Chemistry**, New York, v. 32, n. 14, p. 2988-2995, 2011.
- PLAZINSKI, W.; RUDZINSKI, W. Molecular modeling of Ca²⁺-oligo(α-l-guluronate) complexes: toward the understanding of the junction zone structure in calcium alginate gels. **Structural Chemistry**, Deerfield Beach, v. 23, p. 1409-1415, 2012.
- PRASAD, T. K. Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. **The Plant Journal**, Oxford, v. 10, n. 6, p. 1017-1026, 1996.
- RAJU, R. *et al.* The need for novel cryoprotectants and cryopreservation protocols: Insights into the importance of biophysical investigation and cell

permeability. **Biochimica et Biophysica Acta. General Subjects**, Amsterdam, v. 1865, n. 1, [art.] 129749, 2021.

RALL, W. F.; FAHY, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. **Nature**, London, v. 313, p. 573-575, 1985.

RALL, W. F. *et al.* Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. **Journal of Reproductive & Fertility**, Colchester, v. 80, n. 2, p. 499-504, 1987.

RAUEN, U. *et al.* Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 13, n. 1, p. 155-168, 1999.

RAWSON, D. M.; REID, G. M.; LLOYD, R. E. Conservation rationale, research applications and techniques in the cryopreservation of lower vertebrate biodiversity from marine and freshwater environments. **The International Zoo Yearbook**, Chichester, v. 45, n. 1, p. 108-123, 2011.

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

RIESCO, M. F. *et al.* Evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) PGCs viability and DNA damage using different cryopreservation protocols. **Theriogenology**, Los Altos, v. 77, n. 1, p. 122-130, 2012.

RIOS, P. D. *et al.* Retrievable hydrogels for ovarian follicle transplantation and oocyte collection. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 115, n. 8, p. 2075-2086, 2018.

ROBLES, V. *et al.* Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species. **Theriogenology**, Los Altos, v. 64, n. 7, p. 1633-1646, 2005.

ROJAS, C. *et al.* Vitrification of immature and in vitro matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 49, n. 3, p. 211-220, 2004.

SALEHNIA, M. *et al.* Apoptosis of human ovarian tissue is not increased by either vitrification or rapid cooling. **Reproductive BioMedicine Online**, Amsterdam, v. 25, n. 5, p. 492-499, 2012.

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

SCHMIDT, K. L. T. *et al.* Survival of primordial follicles following prolonged transportation of ovarian tissue prior to cryopreservation. **Human Reproduction**, Oxford, v. 18, n. 12, p. 2654-2659, 2003.

SELMAN, K.; WALLACE, R. A. Cellular aspects of oocyte growth in Teleosts. **Zoological Science**, Tokyo, v. 6, p. 211-231, 1989.

SELMAN, K. *et al.* Stage of oocyte development in the zebrafish *Brachydanio rerio*. **Journal of Morphology**, Philadelphia, v. 218, n. 2, p. 203-224, 1993.

SHAHEDI, A. *et al.* The effect of vitrification on ultrastructure of human in vitro matured germinal vesicle oocytes. **European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology**, Limerick, v. 167, n. 1, p. 69-75, 2013.

SHARMA, G. T.; DUBEY, P. K.; CHANDRA, V. Morphological changes, DNA damage and developmental competence of in vitro matured, vitrified-thawed buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: a comparative study of two cryoprotectants and two cryodevices. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 60, n. 3, p. 315-321, 2010.

SHEIKHI, M. *et al.* Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue. **Human Reproduction**, Oxford, v. 26, n.3, p. 594-603, 2011.

SHEIKHI, M. *et al.* Preservation of human ovarian follicles within tissue frozen by vitrification in a xeno-free closed system using only ethylene glycol as a permeating cryoprotectant. **Fertility and Sterility**, New York, v. 100, n. 1, p. 170-177, 2013.

SHU, Z.; HEIMFELD, S.; GAO, D. Hematopoietic SCT with cryopreserved grafts: adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal before infusion. **Bone Marrow Transplant**, London, v. 49, n. 4, p. 469-476, 2014.

SMIDSRØD, O.; HAUG, A.; BJØRN, L. Properties of poly(1,4-hexuronates) in the gel state. I. Evaluation of a method for the determination of stiffness. **Acta Chemica Scandinavica**, Copenhagen, v. 26, p. 71-78, 1972.

SMIDSRØD, O.; GLOVER, R. M.; WHITTINGTON, S. G. The relative extension of alginates having different chemical composition. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 27, n. 1, p. 107-118, 1973.

SMIDSRØD, O.; SKJÅK-BRAEK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 8, n. 3, p. 71-78, 1990.

SPUTTEK, A. *et al.* (ed.). **Cryopreservation in transfusion medicine and hematology life in the frozen state**. Boca Raton: CRC, 2004. p. 483-504.

STEWART, M. B. *et al.* Exploring the molecular basis for the metal-mediated assembly of alginate gels. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 102, p. 246-253, 2014.

STOKKE, B. T. *et al.* Distribution of uronate residues in alginate chains in relation to alginate gelling properties. **Macromolecules**, Washington, DC, v. 24, n. 16, p. 4637-4645, 1991.

STREISINGER, G. *et al.* Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachudanio rerio*). **Nature**, London, v. 291, n. 5813, p. 293-296.

STREIT JÚNIOR, D. P. *et al.* Qualitative parameters of the piapara sêmen (*Leporinus elongates* Valenciennes, 1850). **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, v. 68, n. 2, p. 373-377, 2008a.

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

STREIT JÚNIOR, D. P. *et al.* Cryopreservation of embryos and oocytes of South American fish species. *In*: YAMASHIRO, H. (ed.). **Recent advances in cryopreservation**. London: Intech, 2014. cap. 3, p. 45-58.

SUCCU, S. *et al.* Vitrification devices affect structural and molecular status of in vitro matured ovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v. 74, n. 10, p. 1337-1344, 2007.

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

TALEVI, R. *et al.* Successful slush nitrogen vitrification of human ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, New York, v. 105, n. 6, p. 1523-1531, 2016.

TAYLOR-ROBINSON, A. W. *et al.* The potential for modification in cloning and vitrification technology to enhance genetic progress in beef cattle in Northern Australia. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 148, n. 3/4, p. 91-96, 2014.

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

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

THIRUMALA, S. *et al.* Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. **Theriogenology**, Los Altos, v. 66, n. 4, p. 964-973, 2006.

TOBIA, C. *et al.* Zebrafish embryo as a tool to study tumor/endothelial cell cross-talk. **Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease**. Amsterdam, v. 1832, n. 9, p. 1371-1377, 2013.

- TONER, M. *et al.* Nonequilibrium freezing on one-cell mouse embryos. Membrane integrity and developmental potential. **Biophysical Journal**, Cambridge, v. 64, n. 6, p. 1908-1921, 1993.
- TRAN, S.; GERLAI, R. Recent advances with a novel model organism: alcohol tolerance and sensitization in zebrafish (*Danio rerio*). **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, Oxford, v. 55, p. 87-93, 2014.
- TSAI, S.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Development of cryopreservation protocols for early stage zebrafish ovarian follicles using controlled slow cooling. **Theriogenology**, Los Altos, v.71, n. 8, p. 1226-1233, 2009.
- TSAI, S.; RAWSON, D. M.; T. ZHANG. Development of in vitro culture method for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles for use in cryopreservation studies. **Theriogenology**, Los Altos, v. 74, n. 2, p. 290-303, 2010.
- TSANG, W. H.; CHOW, K. L. Cryopreservation of mammalian embryos: advancement of putting life on hold. **Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: reviews**, Hoboken, v. 90, n. 3, p. 163-175, 2010.
- TSVETKOV, T.; NAYDENOVA, T. Activity of ATP synthetase complex after low temperature tratment or freeze-drying of mitochondria isolated from skeletal muscles. **Criobiology**, San Diego, v. 24, n. 3, p. 280-284, 1987.
- TSVETKOVA, L. I. *et al.* Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawerd spermatozoa in sturgeons *Acipenser baeri* and *A. ruthenus*. **Journal of Applied Ichthyology**, Hamburg, v. 12, n. 2, p. 107-112, 1996.
- VALDEZ, M. D. *et al.* Sensitivity to chilling of medaka (*Oryzias latipes*) embryos at various developmental stages. **Theriogenology**, Los Altos, v. 64, p. 112-112, 2005.
- VAJTA, G.; NAGY, Z. P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive Biomedicine Online**, Cambridge, v.12, n. 6, p. 779-796, 2006.
- VAJTA, G. *et al.* Vitrification in assisted reproduction: myths, mistakes, disbeliefs and confusion. **Reproductive BioMedicine Online**, Amsterdam, v. 19, p. 1-7, 2009. Supl. 3.
- VAJTA, G. Vitrification in ART? Gatting colser? **Acta Scientiae Veterinerie**, Porto Alegre, v. 38, n. 2, p. 565-572, 2010.
- VAN BLERKOM, J. Mitochondrial function in the humanocyte and embryo and their role in developmental competence. **Mitochondrion**, Amsterdam, v. 11, n. 5, p. 797-813, 2011.
- VETTORI, A. *et al.* Developmental defects and neuromuscular alterations due to mitofusin 2 gene (MFN2) silencing in Zebrafish: a new model for Charcot-

Marie-Tooth type 2A neuropathy. **Neuromuscular Disorders**, New York, v. 21, n. 1, p. 58-67, 2011.

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 35, n. 1, p. 137-150, 2009.

VOLD, I. M. N.; KRISTIANSEN, K. A.; CHRISTENSEN, B. E. A study of the chain stiffness and extension of alginates, in vitro epimerized alginates, and periodate-oxidized alginates using size-exclusion chromatography combined with light scattering and viscosity detectors. **Biomacromolecules**, Washington, DC, v. 7, n. 7, p. 2136-2146, 2006.

WALLACE, R. A.; SELMAN, K. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. **American Zoologist**, Utica, v. 21, n. 2, p. 325-343, 1981.

WALLACE, R. A. Vitellogenesis and oocyte growth in non mammalian vertebrates. *In*: BROWDER, L. W. (ed.). **Developmental biology: a comprehensive synthesis**. New York: Plenum Press, 1985. v. 1, p. 127-177.

WHIRRINGHAM, D. G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. **Nature**, London, v. 233, n. 5315, p. 125-126, 1971.

WHITTINGHAM, D. G.; LEIBO, S. P.; MAZUT, P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C. **Science**, Washington, DC, v. 178, n. 4079, p. 411-414, 1972.

WILMUT, I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development of survival of mouse embryos during freezing and thawing. **Life sciences. Pt. 2: Biochemistry, General and Molecular Biology**, Oxford, v. 11, n. 22, p. 1071-1079, 1972.

WILLADSEN, S. *et al.* Deep freezing of sheep embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 46, n. 1, p. 151-154, 1976.

WILLADSEN, S.; POLGE, C.; ROWSON, L. E. A. The viability of deep-frozen cow embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 52, n. 2, p. 391-393, 1978.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. **Cryobiology**, San Diego, v. 39, n. 2, p. 103-129, 1999.

WONG, K. M.; MASTENBROEK, S.; REPPING, S. Cryopreservation of human embryos and its contribution to in vitro fertilization success rates. **Fertility and Sterility**, New York, v. 102, n. 1, p. 19-26, 2014.

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

WOWK, B. Thermodynamic aspects of vitrification. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 60, n. 1, p. 11-22, 2010.

WEN, Y. *et al.* The protective role of antifreeze protein 3 on the structure and function of mature mouse oocyte in vitrification. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 69, n. 3, p. 394-401, 2014.

WU, W. Zebrafish: a new vertebrate model for visualizing myelination in vivo. **Experimental Neurology**, Orlando, v. 261, p. 278-280, 2014.

YAMAMOTO, K.; ONOZATO, H. Steroid-producing cells in the ovary of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. **Annotationes Zoologicae Japonenses**, Tokyo, v. 41, p. 119-128, 1968.

ZAMPOLLA, T. *et al.* Cytoskeleton proteins F-actin and tubulin distribution and interaction with mitochondria in the granulosa cells surrounding stage III zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. **Theriogenology**, Los Altos, v. 76, n. 6, p. 1110-1119, 2011.

ZARZYCKI, J. *et al.* (ed.). **Glasses and the vitreous state**. Cambridge University Press, 1991. 533 p. (Cambridge Solid State Science Series).

ZERON, Y. *et al.* The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 45, n. 2, p. 143-152, 2002.

ZHANG, T. *et al.* Studies on membrane permeability of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes in the presence of different cryoprotectants. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 50, n. 3, p. 285-293, 2005.

ZHANG, T.; RAWSON, D. M.; MORRIS, G. J. Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*). **Aquatic Living Resources**, Les Ulis, v. 6, n. 2, p. 145-153, 1993.

ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Permeability of dechorionated one-cell and six-somite stage zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos to water and methanol. **Cryobiology**, San Diego, v. 37, n. 1, p. 13-21, 1998.

ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish 441 (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology**, San Diego, v. 32, n. 3, p. 239-246, 1995.

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

ZHOU, X. H. *et al.* Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of novel direct cover vitrification and conventional vitrification. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 60, n. 2, p. 101-105, 2010.