

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

**MORFOLOGIA DE FOLÍCULOS OVARIANOS DE
ZEBRAFISH APÓS CRIOPRESERVAÇÃO
UTILIZANDO UMA CÁPSULA DE METAL**

ITAMAR COSSINA GOMES

Porto Alegre (RS)
2016

CIP - Catalogação na Publicação

GOMES, ITAMAR
MORFOLOGIA DE FOLÍCULOS OVARIANOS DE ZEBRAFISH
APÓS CRIOPRESERVAÇÃO UTILIZANDO UMA CÁPSULA DE METAL
/ ITAMAR GOMES. -- 2016.
69 f.

Orientador: Danilo Streit Jr..

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa
de Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2016.

1. criopreservação de ovários. 2. crioinjúrias. 3.
Zebrafish. I. Streit Jr., Danilo, orient. II. Título.

ITAMAR COSSINA GOMES
Biólogo

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM ZOOTECNIA

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

Aprovado em: 16.08.2016
Pela Banca Examinadora

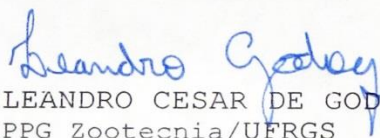


DANILO PEDRO STREIT JR.
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientador

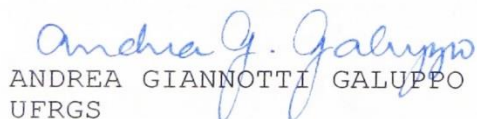
Homologado em: 05.10.2016
Por



PAULO CÉSAR DE FACCIÓ CARVALHO
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia



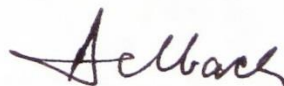
LEANDRO CESAR DE GODOY
PPG Zootecnia/UFRGS



ANDREA GIANNOTTI GALUPPO
UFRGS



PAULA RODRIGUES VILLAMIL
UFRGS



PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de Agronomia

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que fizeram parte dessa jornada, os quais me inspiraram e motivaram a alcançar essa conquista e me tornar o que sou hoje, minha mãe Eguimar, meu pai Jorge, minha irmã Thais e meus amigos, Everton, Lis e Ana.

AGRADECIMENTOS

Aos membros do Departamento e do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRGS por todas as oportunidades, em especial à Ione Borcelli Gonçalves pela atenção e aos amigos Lis Santos Marques, Ana Fossati, Everton Zardo e Daniel Rotili pela ajuda, companheirismo, força e motivação que me deram.

Ao meu orientador Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Jr. Pela confiança e por acreditar em mim, mesmo quando nem eu acreditava.

Ao Setor de Patologia Veterinária da FAVET/UFRGS pela confecção das lâminas histológicas.

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

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

EPÍGRAFE

Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso porque já chorei
demais. Hoje me sinto mais forte,
mais feliz, quem sabe? Só levo a
certeza de que muito pouco eu sei.
Nada sei.”

(Almir Sater)

MORFOLOGIA DE FOLÍCULOS OVARIANOS DE ZEBRAFISH APÓS CRIOPRESERVAÇÃO UTILIZANDO UMA CÁPSULA DE METAL

Autor: Itamar Cossina Gomes

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

RESUMO

O apelo pela conservação ambiental e o significativo aumento no número de organismos cultivados de alto valor genético demandam tecnologias que permitam conservar sua genética, mesmo após a morte do animal. A criopreservação de gametas possibilita a preservação da genética de espécies ameaçadas e de interesse comercial, prolongando sua vida reprodutiva evitando assim a perda de material genético por doenças, catástrofes, transferência de animais ou perda do habitat natural. A criopreservação tem sido aplicada à conservação de ovários e tecido ovariano, no entanto, há muitas controvérsias acerca de qual seria o melhor protocolo a ser utilizado. Tendo isso em vista, o presente estudo teve como objetivo avaliar a morfologia do tecido ovariano de zebrafish criopreservado em cápsula de metal com o uso de diferentes soluções crioprotetoras. As soluções crioprotetoras utilizadas foram: 1,5 M metanol + 4,5 M propileno glicol (SC1); 1,5 M metanol + 5,5 M Me₂SO (SC2); 1,5 M metanol + 4,5 M propileno glicol + 0,5 M sacarose (SC3); 1,5 M metanol + 5,5 M Me₂SO + 0,5 M sacarose (SC4). Após o descongelamento a integridade de cinco estágios de desenvolvimento folicular foi avaliada em cada grupo. A morfologia celular foi observada através de análise histológica. A análise dos dados mostrou que os folículos em estágio I e II foram os melhores criopreservados em todos os grupos experimentais. Sendo que, os grupos SC4 e SC2 foram os que apresentaram os melhores resultados, respectivamente com 88,26% e 84,2% de folículos sem alterações morfológicas. Já os estágios foliculares mais avançados de desenvolvimento (estágios IV e V) apresentaram-se com alterações em todos os grupos. Portanto, apesar do sucesso na criopreservação dos estágios foliculares mais iniciais (I e II) foi possível identificar alterações morfológicas em todos os grupos avaliados. Dentre as principais alterações identificadas estão a aglutinação do citoplasma e enrugamento e ruptura da membrana do envelope celular. Ao avaliar os resultados pode-se concluir que apesar do uso da capsula de metal em associação com as soluções SC4 e SC2 apresentarem os melhores resultados, as soluções SC1 e SC3 também foram eficientes na manutenção da integridade morfológica de folículos imaturos, e portanto essa metodologia pode ser utilizada com sucesso na criopreservação de folículos imaturos.

Palavras-chave: Zebrafish, criopreservação de ovário, vitrificação, crioinjúrias, recipiente de metal, morfologia ovariana.

MORPHOLOGY OF ZEBRAFISH OVARIAN FOLLICLES AFTER CRYOPRESERVATION USING A METAL CAPSULE.

Author: Itamar Cossina Gomes

Advisor: Danilo Pedro Streit Jr.

ABSTRACT

The appeal for environmental conservation and the significant increase in the number of farmed organisms with high genetic value demand technologies to allow preserving their genetics, even after the death. Cryopreservation of gametes allows the preservation of genetics of the endangered and commercial species, prolonging their reproductive life. Furthermore, this technology prevents the loss of genetic material caused by diseases, disasters, transfer of animals or loss of natural habitat. Cryopreservation has been applied to the conservation of ovaries and ovarian tissue, however, there are many controversies regarding what would be the best protocol to use. Thus, the aim of this study was to evaluate the morphology of cryopreserved zebrafish ovarian tissue using a metal capsule with four different cryoprotectant solutions. The cryoprotectant solutions used were: 1.5M methanol + 4.5 M propylene glycol (CS1); 1.5M methanol + 5.5 M Me₂SO (CS2); 1.5M methanol + 4.5 M propylene glycol + 0.5 M sucrose (CS3); Methanol + 1.5 M 5.5 M 0.5 M sucrose + Me₂SO (CS4). After heating the integrity of the five stages of follicular development was assessed in each group. Cell morphology was observed by histological analysis. The thermal gradient inside the capsule and the sample was verified by a thermistor Pt500, model Keithley 2001A. The data analysis shows that the follicles at stage I and II were better cryopreserved among all experimental groups. The treatments CS4 and CS2 showed the best results, respectively with 88.26% and 84.2% of follicles without morphological changes in stage I. The most advanced follicular development stages (stages IV and V) showed changes in all treatments. Therefore, despite the successful cryopreservation of earlier follicular stages (I and II), it was possible to identify morphological changes in all the groups. Among the main changes identified, agglutination of cytoplasm and rupture of cell and wrinkling of the egg envelope could be observed. Despite the use of the metal capsule in association with the CS4 and CS2 solutions showed the best results, CS1 and CS3 solutions were also effective in maintaining the morphological integrity of immature follicles, therefore this method can be successfully used in the cryopreservation of immature follicles.

Keywords: Zebrafish, ovarian cryopreservation, vitrification, cryoinjury, metal capsule, ovarian morphology.

SUMARIO

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO I..... | 12 |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 13 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFIA | 14 |
| 2.1. Introdução à criobiologia..... | 16 |
| 2.1.1 Crioinjúrias..... | 15 |
| 2.2. Agentes crioprotetores..... | 18 |
| 2.2.1. Agentes crioprotetores permeáveis..... | 18 |
| 2.2.2. Agentes Crioprotetores impermeáveis | 19 |
| 2.3. Vitrificação..... | 20 |
| 2.4. Criopreservação de tecido ovariano | 23 |
| 2.4.1. A Criopreservação de germoplasma de espécies aquáticas | 24 |
| 2.5. Sistema aberto versus Sistema fechado | 24 |
| 2.5.1. Sistemas aberto | 25 |
| 2.5.2. Sistema fechado | 25 |
| 2.5.3. Sistema semiaberto ou semifechado..... | 27 |
| 2.6. Zebrafish | 27 |
| 2.6.1. Reprodução e estrutura ovariana | 28 |
| 2.6.2. Oogênese | 29 |
| 3. HIPÓTESES | 31 |
| 4. OBJETIVOS | 31 |
| CAPÍTULO II | 33 |
| MORFOLOGIA DE FOLÍCULOS OVARIANOS DE ZEBRAFISH APÓS CRIOPRESERVAÇÃO UTILIZANDO UMA CÁPSULA DE METAL..... | 34 |
| CAPÍTULO III | 50 |
| 1. CONCLUSÕES | 51 |
| 2. PERSPECTIVAS FUTURAS | 52 |

| | |
|--------------------------|-----------|
| REFERÊNCIAS | 53 |
| VITA | 69 |

RELAÇÃO DE GRÁFICOS

CAPÍTULO II

Gráfico 1: Teste de ANOVA seguida de teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre estágios de maturação. Controle (ovários frescos), SC1 (1,5 M de metanol e 4,5 M de propileno glicol), SC2 (1,5 M de metanol e 5,5 M de Dimetil sulfóxido [Me₂SO]), SC3 (1,5 M de metanol, 4,5 M de propileno glicol e 0,5M de sacarose) e SC4 (1,5 M de metanol, 5,5 M de Me₂SO e 0,5 M de sacarose)..... 39

Gráfico 2: Gradiente térmico em graus célsius em função do tempo em segundos (s) durante o resfriamento e o aquecimento da amostra.....43

RELAÇÃO DE FIGURAS

CAPÍTULO I

FIGURA 1. Arranjos moleculares dos estados físicos da matéria 20

FIGURA 2. Cápsula de metal desenvolvida por Aquino et al., (2014), para criopreservar sistemas biológicos..... 27

CAPÍTULO II

FIGURA 1. Imagens de cortes histológicos do Grupo controle. A: Visão geral do controle indicando os 5 estágios de maturação dos folículos ovarianos de Zebrafish (*Danio rerio*) a objetiva de 5X. B: Estágios I e II, sem alterações morfológicas de membranas e estruturas internas. Estágios I com núcleos periféricos (NC) visíveis na vesícula germinal, estágio II com primeiros alvéolos corticais (AC) visíveis a objetiva de 40X. C : Estágios I, II, III e V sem alterações a uma objetiva de 10X. D: Estágio III a uma objetiva de 20X com vesícula germinal bem definida e envelope celular (EC) destacado, ambos sem alterações. Art em A indica que a alteração na condição geral do folículo pode ter sido causada durante o processo de confecção da lâmina. Imagens obtidas através do microscópio ZeissScope A1 e câmera AxioCamERc 5.....40

FIGURA 2. Imagens do cortes histológicos de ovários submetidos aos diferentes tratamentos (SC1, SC2, SC3 e SC4). A: Folículo em estágio 1 a objetiva de 40X submetido a (SC)1, apresentando (**DM**) descolamento da camada de células foliculares e (**RM**) ruptura da camada de células foliculares. B: Folículo em estágio II a objetiva de 40X submetida a SV2, apresentando **DM** descolamento da camada de células foliculares e aglutinação do ooplasma. C: (SC4) e E (SC3): Folículos em estágio III,IV e V a objetiva de 10X, apresentando (**EC**) enrugamento do envelope celular e no estágio V (**AC**) aglutinação e colapso do ooplasma. D: Folículo em estágio III apresentando (**DG**) descolamento da membrana granulosa e **DM** camada de células foliculares. F: SC3) Visão geral do estado morfológico dos folículos a objetiva de 5X. G: Quadro geral de folículos em estágio I e II submetidos a (SC1) sem alterações aparentes a objetiva de 20X I: Folículos submetidos a (SC2) a objetiva de 10X, apresentando estágios I e II sem alterações aparentes, e estágio III apresentando (**DG**) descolamento da membrana granulosa, camada de células foliculares e ruptura dos alvéolos corticais. Imagens obtidas através do microscópio ZeissScope A1 e câmera AxioCamERc 5.....41-42

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|--------------------------|
| % | porcentagem |
| ± | mais ou menos |
| = | igual a |
| < | menor que |
| > | maior que |
| µg | micrograma(s) |
| µm | micrometro(s) |
| µl | microlitro(s) |
| °C | graus célsius |
| Ca | alvéolo cortigal |
| CP(s) | crioprotetor(es) |
| LN ₂ | nitrogênio Líquido |
| M | molar |
| Me ₂ SO | dimetilsulfóxido |
| mg | miligrama(s) |
| Min | minuto(s) |
| mL | mililitro(s) |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| s | Segundo(s) |

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os estoques naturais de organismos aquáticos de importância comercial encontram-se estagnados e sob risco de esgotamento em função da sobrepesca, que por sua vez não supre a crescente demanda de pescado no cenário mundial (Resende, et al., 2010). Assim, a aquicultura tornou-se uma atividade agropecuária de extrema importância nas últimas décadas, pois garante a produção de proteína de alta qualidade e eleva o status de segurança alimentar; além de atenuar a pressão da pesca extrativista sobre os estoques naturais (Resende, et al., 2010; FAO, 2011).

A fim de evitar a extinção de espécies aquáticas selvagens e cultivadas, seja por doenças, catástrofes, transferência de animais ou perda do habitat natural, programas de conservação tem sido implantados por todo o mundo (Rawson, et al., 2011). Neste contexto a criopreservação de gametas de organismos aquáticos mostra-se como um importante recurso para garantir a preservação do genoma de espécies ameaçadas pela redução dos estoques naturais, e aumentar a representação de espécies de interesse comercial, além disso, aumenta o tempo de vida reprodutiva desses animais mesmo após a morte (Reid & Haal, 2003; Hagedorn, et al., 2012). Em peixes, a criopreservação de gametas masculinos já está bem estabelecida e tem sido utilizada na reprodução de espécies selvagens e de cativeiro (Fornari, et al., 2012). No entanto, essa prática preserva apenas o genoma masculino, deixando de lado as características do genoma feminino, os quais são indispensáveis para preservação do genoma da espécie (Godoy, et al., 2013).

A criopreservação de folículos e tecido ovariano de peixes é uma ferramenta promissora para conservação de genomas, garantindo a preservação de um animal de grande valor zootécnico ou ainda de espécies em extinção. A criopreservação de folículos apresenta vantagens quando comparada a criopreservação de embriões, como por exemplo, o menor tamanho e ausência de um córion completamente formado (Tsai, et al., 2009). A vitrificação tem sido utilizada na tentativa de criopreservar folículos e embriões de peixes (Cobo, et al., 2008; Guan, et al., 2010; Cobo, et al., 2011; Godoy, et al., 2013;; Marques, et al., 2015). A vitrificação consiste na solidificação de soluções aquosas sem que haja a formação de cristais de gelo, e esse processo é facilitado pela utilização de agentes crioprotetores (CPs) em altas concentrações e uma ultra rápida taxa de resfriamento (Rall & Fahy, 1985). A vitrificação apesar de apresentar vantagens como baixo custo, pois não necessita de equipamentos sofisticados, desperta discussões acerca de aspectos tais como toxicidade dos CPs, que são utilizados em altas concentrações e biossegurança. O nitrogênio líquido (NL) é uma fonte potencial de contaminação microbiana (Bielanski, 2012), assim, pesquisadores tem questionado a utilização de sistema abertos, os quais permitem o contato direto da amostra com o NL, e sugerem que os sistemas fechados, em que isolam completamente a amostra do NL seriam mais seguros (Vajta, et al., 2015). Além disso, a contaminação pode ocorrer durante os

procedimentos de criopreservação ou durante o armazenamento em recipientes indevidamente selados ou danificados (Parmegiani, et al., 2010).

Visando suprir essas necessidades, Aquino e colaboradores (2014) manufaturaram um recipiente em aço inoxidável, desenvolvido de forma a possibilitar o fechamento hermético, que impediria o contato do NL com a amostra. Além disso, o aço inox apresenta a característica de ser um excelente condutor térmico, característica desejada na vitrificação. Estudos mostraram que a utilização de recipientes de metal hermeticamente fechados pode ser benéfica a criopreservação de folículos primordiais e primários de murinos (Bos-Mikich, et al., 2012), bovinos (Aquino, et al., 2014) e peixes (Marques, et al., 2015).

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar o efeito de diferentes combinações de crioprotetores sobre a morfologia de folículos ovarianos de zebrafish sob os efeitos do microambiente proporcionado pela cápsula de metal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Introdução à Criobiologia

A Criobiologia (do grego *kryos* = frio, *bios* = vida, e *logos* = ciência) é o estudo da vida em baixas temperaturas e dos impactos que estas causam aos materiais biológicos. É um campo de pesquisa inteiramente interdisciplinar, e tem como objeto de estudo qualquer material biológico submetido à uma temperatura abaixo de sua variação fisiológica. Para resolver quaisquer questões, por mais triviais que sejam, em criopreservação, por exemplo, requer conhecimentos específicos em criobiologia oriundos da biologia, medicina, termodinâmica e outras áreas do conhecimento científico. Porém a maior parte dos estudos e aplicações da criobiologia estão focados em temperaturas abaixo do ponto de congelamento, dessa forma busca-se compreender os efeitos do resfriamento e aquecimento sobre o material biológico.

Os primórdios da criobiologia remontam ao século XVII com os estudos de Robbert Boyle, Jhon Hunter e Sallanzani. Em 1940 Luyet e Gehenio em “*Life and Death at Low Temperatures*”, congelaram uma grande variedade de tecidos e organismos, ao constatar a morte de muitas células após o congelamento em função de cristais de gelo, sugeriram que poderiam evitar a formação de gelo nas células resfriando-as rapidamente, fato que ficou comprovado após constatar a sobrevivência de células resfriadas rapidamente.

Em 1949, Polge, Smith e Pakers relataram uma alta taxa de sobrevivência após o descongelamento de espermatozoides criopreservados de galinha com a adição de glicerol, dando assim um novo rumo à 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.

Estes avanços na criobiologia possibilitaram a compreensão de diversos fenômenos biológicos, físicos e químicos que ocorrem abaixo de 0°C. Permitindo criar estratégias para inibi-los ou manipula-los, dessa forma, pode-se evitar o comprometimento do material resfriado, que é normalmente mantido em gelo seco (-80°C), em vapor de NL (-130°C) ou mais amplamente utilizados imersos em NL a (-196°C), que são temperaturas que 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, desta forma, com todo o metabolismo estagnado, atividade biológica e reações bioquímicas que causariam o envelhecimento e morte celular são definitivamente paralisados (Mazur, et al., 1984). No entanto, a criopreservação por si só, ocasiona injúrias celulares durante os processos de resfriamento e aquecimento, podendo ocasionar a morte celular. Dessa forma, há muito que se descobrir e compreender em criopreservação, e pesquisadores de diversas áreas tem se interessado e investido no assunto, em função de suas possíveis aplicações práticas.

2.1.1. Crioinjúrias

Em temperaturas hipotérmicas, ou seja, abaixo da temperatura fisiológica, as células já estão sujeitas a injúrias pelo frio, podendo ser divididas em dois tipos, as de resfriamento lento e injúrias ocasionadas por quedas bruscas de temperatura (choque frio) (Belous & Grishenko, 1994). O resfriamento influi nos processos enzimáticos e não enzimáticos no interior das células, alterando o equilíbrio homeostático, conseqüentemente pode haver estresse oxidativo e peroxidação de lipídios resultando em apoptose. O choque frio ocasionado por taxas de resfriamento rápido podem acarretar lesões de membranas, intensificar o gradiente osmótico pela perda de K⁺ tornando-as mais permeáveis.

Uma das principais causas de morte celular ocasionada pelo processo de criopreservação está fortemente relacionada com as alterações sofridas pela 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 instauração e da concentração de proteínas, características que podem ser utilizadas como indicador de fluidez (Giraund, et al., 2000). O gelo pode se formar através da membrana plasmática após uma lesão, oriunda de um gradiente osmótico, conseqüente do efluxo de água gerado pelo gradiente de temperatura (Muldrew & McGann, 1994). 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, variando de espécie para espécie, e esse fenômeno foi relatado principalmente em suínos (Dobrinsky, 2001), felinos (Luvoni, 2006; Galiguis, et al., 2014) e peixes (Isayeva, et al., 2004).

Tais alterações em especial no estado físico podem comprometer as propriedades físico-químicas dos lipídios, e isso se reflete em todas as estruturas as quais estão associados, podendo causar deformação, ruptura e consequente colapso do citoesqueleto (Bodin, et al., 2005; Isachenko, et al., 2001; Okada, et al., 2014). O citoesqueleto é responsável pela condução das funções cinéticas dentro 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. 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). Danos 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). 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 (Tajima & Shimizu, 1973). De forma geral, células submetidas a 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 (Guerin, et al., 2001; Lister, et al., 2010a, b; McKersie, et al., 1990; Prasad, 1996; Riesco, et al., 2012; Scandalios, 1993; Tsang, et al., 1991; Wood & Youle, 1995). 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).

Quanto aos danos ao material genético favorecidos pela criopreservação, parece não haver consenso quanto a frequência e intensidade das lesões, indicando que esse fenômeno pode estar fortemente relacionado com a natureza do material criopreservado e o protocolo utilizado. Um estudo relata 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 (Fatehi, et al., 2014). Em outro estudo comparando vitrificação e congelamento lento, afirmou que ambos conservaram as características morfológicas das células, no entanto, a vitrificação foi mais eficiente na proteção da integridade do DNA (Wong, et al., 2015). É notável a necessidade da realização de mais estudos que visem compreender melhor os efeitos específicos de cada protocolo de criopreservação sobre o material genético das células utilizadas.

A criopreservação também pode afetar a morfologia e o funcionamento das mitocôndrias que são extremamente sensíveis ao frio (Tsvetkov & Naydenova, 1987). O simples resfriamento das células de animais e plantas, fazem com que suas mitocôndrias tornem-se superpermeáveis e inchadas (Rauen 1999). Sabe-se que a formação de cristais de gelo acomete as cristas e a matriz mitocondrial (Mazoochi, et al., 2008; Bonetti, et al., 2011), fato que em certa amplitude pode prejudicar seriamente o metabolismo celular (Shahedi, et al., 2013). No caso de embriões criopreservados, o acometimento das mitocôndrias é extremamente nocivo, pois o ATP produzido é fundamental para a manutenção do desenvolvimento, em especial na embriogênese inicial, principalmente para as divisões mitóticas que demandam um alto gasto energético (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. Um estudo realizado

com oócitos humanos demonstrou a presença de matrizes elétron-densas e cristas bem preservadas, indicando que as condições proporcionadas pela metodologia empregada preservou a integridade das mitocôndrias (Bonetti, et al., 2011).

2.2. Agentes crioprotetores

Os crioprotetores são compostos químicos naturais ou sintéticos utilizados com o propósito de proteger as células de possíveis lesões ocasionadas durante o processo de criopreservação, seja no resfriamento ou aquecimento. Dentre suas funções, a de maior destaque é a de promover um gradiente osmótico que remove e/ou substitui a água no interior da célula (Ebertz & McGann, 2004). Os crioprotetores são divididos em dois tipos, os permeáveis (internos ou intracelulares) e não permeáveis (externos ou extracelulares). A ação dos agentes crioprotetores consiste basicamente em aumentar a permeabilidade da membrana e realizar a desidratação parcial da célula, reduzindo o limiar de congelamento, o que evita a formação de cristais de gelo no interior das células (Rosato & Iaffaldano, 2013).

Os agentes crioprotetores, tanto extracelulares quanto intracelulares, interagem com os fosfolípidios na membrana celular, garantindo maior estabilidade a membrana durante a criopreservação (Dong, et al., 2009). Portanto, os crioprotetores agem aumentando a resistência das membranas, e controlando os gradientes osmóticos da desidratação durante o resfriamento e aquecimento, reduzindo a incidência de danos. Estudos indicam que os efeitos tóxicos dos crioprotetores são particulares a cada agente. Estratégias, como o uso de crioprotetores menos tóxicos e a combinação de dois ou três CPs, tem sido utilizadas nos procedimentos de criopreservação (Vajta & Nagy, 2006; Fahy, et al. 2004).

Apesar de a utilização de agentes crioprotetores ser indispensável ao sucesso da criopreservação, todos eles apresentam certa toxicidade com vias de ação diferentes. No entanto apresentam efeitos similares sobre as células, causando estresse osmótico inevitável, que pode danificar seriamente as estruturas intracelulares e membranas (Armitage, 1987; Higaki, et al., 2013). Além do estresse osmótico, o efeito de inchar-encolher sobre a célula, os crioprotetores em altas concentrações podem promover o colapso da bicamada lipídica e desnaturação de proteínas por influírem diretamente em suas estruturas secundárias acometendo as funções enzimáticas (Fink, 1986; Musa, et al., 1995).

2.2.1. Agentes crioprotetores permeáveis

Os crioprotetores intracelulares são em teoria substâncias orgânicas de alta solubilidade e de baixo peso molecular capazes de penetrar as células e

desempenhar sua ação crioprotetora por todo o citoplasma e organelas, por isso, também são chamados de crioprotetores permeáveis (Hubálek, 2003). Um agente crioprotetor permeável deve apresentar como características: a) baixo peso molecular, b) baixa toxicidade e c) alta capacidade de atravessar a membrana celular (Fahy, et al., 2010).

Os crioprotetores intracelulares mais comumente utilizados são: o etilenoglicol, o dimetilsulfóxido (Me_2SO), o propilenoglicol e o glicerol (Merino, et al., 2011). O glicerol é usado frequentemente na criopreservação de sêmen de diferentes espécies e tem baixa toxicidade. No entanto, não é recomendado para a criopreservação de oócitos e tecido ovariano devido à sua baixa solubilidade (Rodriguez-Wallberg & Oktay, 2012). Porém, o etilenoglicol, o propilenoglicol e o Me_2SO são altamente hidrossolúveis e penetram rapidamente as membranas celulares. O Me_2SO possui peso molecular de 78 e é rapidamente permeável através das membranas (Hubálek, 2003). O propilenoglicol possui peso molecular 76 e é caracterizado por uma baixa toxicidade aos oócitos de peixes, sendo considerado atualmente como um composto não-genotóxico ou carcinogênico (Aye, et al., 2010) e o etilenoglicol, possui peso molecular 62 e é um diálcool com rápida capacidade de difusão (Baudot & Odagescu, 2004).

O uso de álcoois monovalentes como agentes crioprotetores é pouco frequente e não é recomendável, pois essas substâncias apresentam alta toxicidade. Porém, o metanol e, em menor concentração, o etanol, apresentam certa eficácia na criopreservação de algumas células procarióticas e eucarióticas (Hubálek, 2003). Zhang e colaboradores (2005) sugeriram que o metanol, por apresentar baixo peso molecular (32) possuiria alta taxa de permeabilidade, que supera significativamente a do Me_2SO . Um estudo avaliando a toxicidade de crioprotetores em embriões de zebrafish relatou que o metanol foi menos tóxico que o Me_2SO após exposição por 30 min (Zhang, et al., 1996).

2.2.2. Agentes crioprotetores impermeáveis

Ao contrário dos agentes protetores intracelulares, os crioprotetores extracelulares apresentam alto peso molecular e são normalmente açúcares ou polímeros, portanto, possuem baixa permeabilidade as membranas celulares, sendo denominados também de crioprotetores não permeáveis (Hubálek, 2003). Por apresentarem características hidrofílicas, eles se ligam às moléculas de água, aumentando a viscosidade da solução o que por sua vez reduz a formação de cristais de gelo (Fahy, 2007).

Frequentemente os crioprotetores extracelulares são usados em conjunto com os crioprotetores intracelulares, o que ajuda a controlar a reidratação celular durante o aquecimento (Yavin, et al., 2009). A adição de sacarose à solução crioprotetora ou de aquecimento cria um potencial osmótico que possibilita a retenção de água no meio extracelular, dessa forma, o gradiente osmótico faz com que a saída do crioprotetor intracelular seja mais rápida que a entrada de água na célula durante o aquecimento (Fahy, 2007). A adição de sacarose ou

açúcares de forma geral à solução de vitrificação aumenta a viscosidade e a temperatura de transição vítrea, diminuindo o risco de lesões tóxicas causadas pelo agente crioprotetor. Os açúcares reduzem a concentração relativa dos crioprotetores e estas condições mostram-se favoráveis ao sucesso na vitrificação (Rodrigues et al., 2008; Godoy et al. 2013). A utilização de elevadas concentrações de sacarose em soluções crioprotetoras e de aquecimento aumentam as taxas de sobrevivência de células criopreservadas quando submetidas a fertilização e desenvolvimento embrionário *in vitro* (Bianchi, et al., 2005; Borini, et al., 2006; Bianchi, et al., 2007).

2.3 Vitrificação

A ideia geral da vitrificação (do grego *vitri* = vidro) é um princípio um tanto quanto simples, dado que a matéria em condições naturais encontra-se em três estados: sólido, líquido e gasoso, no entanto, 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. A conformação atômica no estado vítreo, embora apresente um arranjo desordenado, permanecem numa posição fixa (Figura 1). 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 o resfriamento seja rápido, não havendo tempo para que ocorra a reorganização da estrutura atômica dos materiais, requerida pela cristalização (Zarzycki et al., 1991).

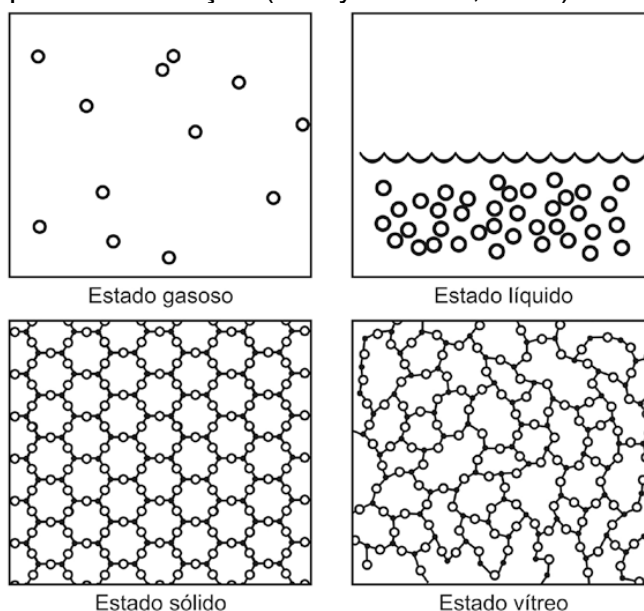


Figura 1. Arranjos moleculares dos estados físicos da matéria. (fonte: <http://vilafloquirmica12.blogspot.com.br/>).

Na técnica de vitrificação, as células ou tecidos a serem criopreservados ficam em suspensão em uma solução de vitrificação por um determinado período, em seguida é mergulhada em nitrogênio líquido, ou em vapor de nitrogênio. A vitrificação 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). Para o aquecimento, estas células devem ser aquecidas rapidamente e normalmente hidratadas em uma solução de sacarose.

A fase mais importante consiste na exposição das células à solução de vitrificação e logo após o resfriamento super rápido. Com o intuito de evitar a formação de gelo intracelular, longas exposições ao agente crioprotetor são comumente realizadas, no entanto, se a exposição for demasiadamente longa, as células podem sofrer lesões tóxicas. Para se obter uma vitrificação de sucesso e garantir a sobrevivência das células, para se evitar a formação de gelo intracelular e lesões tóxicas, deve-se atingir um “tempo ótimo” de exposição aos crioprotetores. Por outro lado, as células podem ser lesionadas pela toxicidade do crioprotetor mesmo antes que ele possa adentrar a membrana celular e ocupar o interior da célula. Para evitar esse fenômeno, adotam-se comumente dois procedimentos, que consistem basicamente em deixar as células numa solução de equilíbrio com uma menor concentração de crioprotetor, e em seguida submetê-los à solução de vitrificação por um período de tempo menor que varia de 30-60 segundos, e então resfria-los em nitrogênio líquido. Sabe-se que o tempo de exposição ótima à 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)

O aumento da concentração dos agentes crioprotetores e o aumento das taxas de resfriamento são fatores indispensáveis a vitrificação. A alta concentração de crioprotetores e o resfriamento rápido facilitam a vitrificação, no entanto há uma correlação inversa entre os dois fatores, pois: quanto maior o gradiente de temperatura, menor será a necessidade da alta concentração do crioprotetor 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 comuns (Rall, et al., 1987). Por outro lado, com o aumento considerável das concentrações dos crioprotetores, as soluções podem ser vitrificadas com moderadas taxas de resfriamento. Em criobiologia reprodutiva, essa ferramenta ainda não pode ser utilizada de forma 100% eficiente para todas as espécies, dado que os agentes crioprotetores apresentam certa toxicidade. Portanto, a missão em aperfeiçoar a arte da vitrificação na reprodução assistida, concentra-se em criar uma maneira prática e segura de alcançar a condição ótima de resfriamento e aquecimento, e a combinação ideal de crioprotetores que em menor concentração, possam garantir o estado de vitrificação de forma segura para as células tanto intra quanto extracelular, tanto no resfriamento quanto no aquecimento (Vajta, et al., 2009).

Um outro mito comum entre os criobiologistas, refere-se a necessidade de os agentes crioprotetores aumentarem a viscosidade da solução. É possível, que essa ideia tenha sido criada pelo fato de o conceito geral da formação do estado vítreo é o aumento extremo da 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. 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, a solução criopreservada deve apresentar-se de forma transparente e sem quaisquer traços de manchas brancas indicando a formação de gelo. Porém, 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 que circunda a amostra, e mergulha-la 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 em sistemas completamente fechados por exemplo (Vajta, et al., 2009).

Como vantagem em relação ao congelamento lento, a vitrificação dispensa equipamentos sofisticados, já que a exposição ao nitrogênio líquido pode ser efetuada de maneira prática e eficiente numa pequena caixa de isopor (Vajta, et al., 2010). Outra vantagem da técnica é ser extremamente rápida quando comparada ao congelamento lento, o qual requer uma duração de em média três horas enquanto a vitrificação apenas minutos (Al-Azawia, et al., 2013). Além disso, a vitrificação pode minimizar as crioinjúrias no citoesqueleto e nas membranas celulares devido às altas taxas de resfriamento obtidas por essa técnica (Sharma, et al. 2010). A intensidade do gradiente térmico reduz as lesões a porções lipídicas e do citoesqueleto, por passar 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 se preservar tecidos de mamíferos, como humanos (Zhou, et al., 2010), Caprinos (Carvalho, et al., 2013), Murinos (Fathi, et al., 2013), sendo então utilizada na reprodução assistida em mamíferos, 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); e Bovinos (Kagawa, et al., 2009) principalmente, esses fatos tornam ainda maiores as expectativas em se criopreservar com sucesso oócitos de peixes.

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.

Em murinos, a vitrificação de oócitos não ocasionou danos cromossômicos e ao serem cultivados, o desenvolvimento fetal se assemelhou àqueles obtidos de fertilização *in vitro* (Bos-Mikich, et al. 1995). Yan Wen et al., (2014), constatou uma alta taxa de sobrevivência ao adicionar proteínas anti-congelamento às soluções de equilíbrio e vitrificação. No intuito de compreender o efeito de diferentes taxas de resfriamento e aquecimento. Em 2011, Mazur e colaboradores submetem oócitos de ratos a quatro taxas de resfriamento indo de 95 a 69.250 °C/min até -196 °C), e cinco taxas de aquecimento variando de 610 a 118.000 °C/min até superar 0°C. Os autores constataram 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.

A elevada sensibilidade da sobrevivência à taxa de aquecimento sugere que houve cristalização no fluido intracelular durante o aquecimento ou o crescimento de pequenos cristais de gelo intracelulares formados durante o resfriamento, e estes podem ser os responsáveis pela a letalidade do aquecimento lento. Quanto mais estudos específicos são realizados, mais clara parece à relação entre as velocidades de resfriamento e principalmente aquecimento com a sobrevivência das células criopreservadas. A utilização de pulsos de laser para aquecer amostras oóctios de ratos vitrificados relatou em taxas de sobrevivência superiores a 80% (Bo-Jin, et al., 2014).

2.4. A criopreservação de tecido ovariano

A criopreservação do genoma materno é extremamente importante para manter as características genéticas da espécie de interesse, dado que o DNA mitocondrial e mRNAs são herdados do gameta feminino, e esses fatores são determinantes para os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (Zhang, et al., 2007). No entanto, a criopreservação de oócitos e embriões de peixes ainda não está estabelecida. Estudos realizados em criopreservação de oócitos e tecido ovariano sugerem que oócitos mais jovens, imaturos, inclusos em folículos pré-antrais, em especial os primordiais, são dotados de características que lhes conferem maior tolerância aos efeitos da criopreservação do que os oócitos maduros (LU, et al., 2014; Marques, et al., 2015; Shaw, et al., 2000;). Oócitos primordiais apresentam menor tamanho, células da granulosa em menor tamanho e quantidade, pequena quantidade de lipídios intracitoplasmáticos, baixo metabolismo, não apresentam zona pelúcida e de grânulos corticais, e encontram-se estagnados em prófase I (Hornick, et al., 2012; Kagawa, et al., 2009; Shaw, et al., 2000;).

2.4.1 A criopreservação de germoplasma de espécies aquáticas

A criopreservação de germoplasma de espécies aquáticas garante conservar as características genéticas e capacidade reprodutiva de espécies de interesse, ameaçadas de extinção ou de alto valor zootécnico. Além disso, este recurso permite transferências entre locais (Cerdà, et al., 2007; Zhang et al., 2007; Fornari, et al., 2012) e evita a perda genética ocasionada por doenças, catástrofes, predação intensiva ou barreiras artificiais como barragens. Em aquacultura a criopreservação de sêmen está estabelecida, e bem documentada com sucesso em de mais de 200 espécies (Billard & Zhang, 2001; Linhart, et al., 2005; Thirumala, et al., 2006; Streit Jr, et al., 2008; Viveiros & Godinho, et al 2009), no entanto, para oócitos e embriões ainda não foram estabelecidos protocolos de sucesso (Godoy, et al., 2013).

2.5. Sistema aberto versus sistema fechado

A vitrificação é atualmente a abordagem dominante para a criopreservação de oócitos e embriões humanos, no entanto, sérias discussões persistem particularmente no que se refere à biossegurança. Os sistemas de criopreservação são categorizados como “aberto” ou “fechado” de acordo com contato entre o meio e o nitrogênio líquido durante a criopreservação. Os sistemas fechados são caracterizados por manter as amostras fisicamente separadas do nitrogênio durante todo processo de resfriamento, enquanto que os sistemas abertos permitem o contato direto entre o nitrogênio líquido e as amostras (Bielanski, et al., 2009). Os adeptos de sistemas fechados enfatizam o perigo em potencial da transmissão de doenças mediante o contato com nitrogênio líquido, e tentam garantir mais segurança com essa abordagem. Já os defensores da utilização de sistemas abertos, afirmam que não há provas suficientes para afirmar que há a transmissão de doenças (Vajta, et al., 2015).

O nitrogênio líquido pode conter alguns agentes contaminantes, portanto, o contato direto pode causar transferência de doenças e contaminações. Durante os últimos anos, utilização do sistema aberto ou fechado, tem se gerado polêmica nos fóruns especializados, e tem incluído diversos temas como ética, legislação. E diversas questões tem sido levantadas e perseguidas como: a) qual a definição exata de sistema aberto e fechado? Sua distinção é bem evidente? O fato de serem fechados, garante que estarão sempre seguros, da contaminação por nitrogênio ou outros fatores contaminantes? B) Qual o risco teórico e prático da transmissão de doenças via nitrogênio líquido ou vapor de nitrogênio? C) Sistemas fechados são tão eficientes quanto os abertos para criopreservação? D) Quais condições éticas e legais serão consideradas ao se escolher o procedimento apropriado? e) Quais medidas podem ser implementadas para minimizar ou eliminar os riscos de contaminação entre amostras (Vajta, et al., 2015).

Diversas são as ferramentas citadas para uso em vitrificação, atualmente mais de 15 versões estão disponíveis comercialmente, varias delas com apenas ligeiras modificações funcionais ou meramente estéticas, como por exemplo as palhetas (OPS). (Vajta, et al., 1998a). O Cryoloop (Lane, et al., 2001; Lane, et al., 1999), e o Cryotop (Hamawaki, et al., 1999). Todos sistemas abertos em sua forma original. E a maior parte dos sistemas fechados, são claramente modificações desses sistemas abertos.

2.5.1 Sistema aberto

Os sistemas completamente abertos, abrangem as palhetas desprotegidas OPS (Open Pulled Straw)(Vajta, et al., 1998^a), Cryotop (Hamawaki, et al., 1999), Cryotech (Gutnisky, et al., 2013), Cryolock (Garcia et al., 2011), Cryoleaf (Chian et al., 2009), Vitri-inga (Almodin, et al., 2010). A utilização desses equipamentos, não importando o método, permite que as amostras entrem em contato direto com o nitrogênio líquido, o que predisporia as amostras à contaminantes presentes no nitrogênio, e à quaisquer outros contaminantes presentes nas demais amostras. Em contra partida, o gradiente térmico é muito maior, fazendo com que tanto o resfriamento quanto para o aquecimento aconteça de forma muito mais rápida (Bielanski, et al., 2009; Parmegiani & Vajta, 2011; Parmegiani, et al 2012).

2.5.2 Sistema fechado

O principal objetivo da utilização e necessidade de melhoria dos sistemas fechados é a segurança. Os criotubos são os recipientes mais populares em laboratórios para a criopreservação e armazenamento de tecido ovariano em nitrogênio líquido (NL). No entanto, por não serem perfeitamente selados são permeáveis ao NL, podendo acarretar contaminação microbiana, e inclusive explosões acidentais após a retirada do frasco do NL (Chen et al., 2006). Em capilares de paredes finas, estreitas e fechadas, incluindo o Cryotip (Kuwayana, et al., 2005) e o Micropette (Parmegiani, et al., 2012) o dispositivo é selado antes do resfriamento e aberto apenas após o aquecimento. Para o aquecimento são mergulhas em água, e as palhetas são cortadas. O guia recomendado para a utilização do Cryotip e do não sugerem quaisquer medidas de descontaminação após a imersão em nitrogênio, ou para o aquecimento em água, e todos em teoria apresentariam riscos de contaminação (Panagiotidis, et al., 2013; Papatheodorou, et al., 2013).

A utilização de recipientes fechados tem se tornado popular, e consiste basicamente em colocar as ferramentas de suporte das amostras dentro de um recipiente selado, e estas estariam separadas e em relativa segurança durante todas as etapas: resfriamento, armazenamento e aquecimento (Kuleshova, et al., 2000). Palhetas também podem ser utilizadas como sistema fechado (Isachenko, et al., 2006), exemplos como: o “kit de alta segurança para vitrificação” (Abdelhafez, et al., 2011), e o Vitrisafe (Vanderswalmen, et al., 2009), podem oferecer maior proteção às amostras durante o processo de

vitrificação, além de serem superiores às palhetas tradicionalmente utilizadas, no entanto, podem comprometer as taxas de resfriamento, dado que não permitem a mesma dissipação térmica (Vanderzwalmen, et al., 2009).

A atenção à segurança do material biológico criopreservado aumentou significativamente após uma transmissão de hepatite B humana através do transplante de medula óssea criopreservada em NL (Tedder, et al., 1995). Assim, novas abordagens para evitar o contato direto com NL vem sendo abordadas, como a esterilização do NL por filtração (McBurnie, et al., 2002; Lin, et al., 2011) ou por radiação ultravioleta (Parmegiani, et al., 2010). Entretanto, os tratamentos por filtração e radiação não garantem a ausência de contaminação do material biológico por vírus (Hawkins, et al., 1996).

Entre as causas de contaminação anteriores ao procedimento de criopreservação estão: não assepsia durante a coleta de sêmen; contaminação dos oócitos por sangue durante a coleta; recipientes inapropriadamente selados ou fechados por métodos não herméticos; superfícies de palhetas e outros materiais contaminados; ferramentas de armazenagem não esterilizadas, são fatores que propiciam a contaminação, até mesmo a abertura dos botijões de NL acabam permitindo a mistura do ar atmosférico com o vapor de nitrogênio podendo também causar contaminação. O nitrogênio líquido não é usualmente transportado sob condições assépticas, o que teoricamente o torna não estéril. Muito embora a maior parte dos agentes infecciosos sejam normalmente destruídos no processo; amostras contaminadas (células espermáticas e oócitos) não podem ser descontaminadas (Vajta, et al., 2015).

Recipientes hermeticamente fechados podem garantir a segurança apropriada contra possíveis contaminações durante todo o processo de criopreservação. Na prática, o único método que é realmente seguro de fechamento hermético de tampas ou contentores, é a “termo-selagem”. O uso de tampões de algodão, como utilizados comumente em sêmen, ou as tampas rosqueáveis do criotubos ou tampas de diversos outros equipamentos de vitrificação não fornecem a proteção adequada ao nível que se deseja.

A vedação por calor, mesmo que desenvolvida de forma profissional, seria um procedimento extremamente exigente, e seu resultado dependeria intimamente de muitos fatores, incluindo o material, a espessura de sua parede, diâmetro, temperatura, resistência a temperatura e gradiente térmico, resistência a pressão duração do aquecimento, e como esse poderia influenciar nas amostras. Quaisquer procedimentos mal executados neste contexto poderia resultar e muitos problemas, como vazamentos de difícil detecção, danos a parede do recipiente, o que o deixaria propenso a explosões ou vazamentos, que poriam em risco a integridade do material e o manipulador (Parmegiani, et al., 2010; Vajta, et al., 2015). Um problema recorrente após a criopreservação é a expulsão de material dos recipientes fechados durante o aquecimento, reforçando a necessidade de um recipiente hermeticamente fechado que reúna todas, senão a maior parte das características referentes à segurança, tanto para todos os aspectos referentes ao armazenamento, quanto seu manuseio.

No intuito de acelerar a redução de temperatura em um sistema fechado asséptico, Aquino et al. (2014) desenvolveram um recipiente manufaturado em aço inoxidável (Figura 2), que além de ser um excelente condutor de temperatura, evita o contato direto com o vapor ou o próprio NL. Após a

vitrificação de tecido ovariano bovino neste recipiente de metal, os autores observaram elevadas taxas de folículos primordiais e primários morfológicamente normais.



Figura 2. Cápsula de metal desenvolvida por Aquino et al. (2014) para criopreservação de sistemas biológicos.

2.5.3 Sistema semiaberto ou semifechado

O resfriamento semifechado está associado tanto a sistemas abertos quanto fechados. No caso do (Cryohook a amostra é colocada na superfície de um bloco de metal que fica parcialmente submerso em nitrogênio líquido. Ou dentro de uma palheta parcialmente submersa em nitrogênio líquido (Larman, et al., 2011). Em ambos os casos é inevitável a presença do vapor de nitrogênio, o que teoricamente teria potencial para haver contaminação (Grout, et al., 2009). Esses sistemas, apesar de haver controvérsias, por não serem fechados, não são inteiramente biosseguros. As taxas de resfriamento podem ser elevadas, em especial nas de metal, no entanto ao se utilizado vapor de nitrogênio, o resfriamento pode ser comprometido, dado que não atinge temperaturas tão baixas quanto o NL. Quanto ao aquecimento, as taxas podem ser idênticas as dos sistemas totalmente abertos (Vajta, et al., 2015).

2.6. Zebrafish

O zebrafish (*Danio rerio*) é um peixe teleósteo, ovíparo, nativo das bacias hidrográficas dos arredores do leste da Índia, sendo também encontrados no Paquistão, Bangladesh, Nepal e Birmânia (Axelord & Schultz, 1955). A espécie, além de ser muito utilizada por aquaristas no mundo inteiro tem se tornado popular como modelo biológico na pesquisa médica. O zebrafish foi estabelecido e utilizado em laboratório pela primeira vez nos anos 70 por Streisinger e colaboradores, como um modelo em potencial para se aplicar metodologias de análise genética no desenvolvimento de vertebrados. A partir disso, os

subsequentes trabalhos fizeram com que o zebrafish se tornasse uma valiosa ferramenta para o estudo nas mais variadas áreas da pesquisa.

O zebrafish atinge maturidade sexual por volta de 10-12 semanas de vida, e a partir disso as fêmeas podem desovar a cada 2 a 3 dias, podendo liberar centenas de oócitos a cada desova (Lawrence, 2007). Além disso, esses animais apresentam outras características vantajosas como: embrião transparente, permitindo a literal visualização da origem e formação dos tecidos; rápido desenvolvimento e relativamente curto ciclo de vida, o que possibilita a aquisição de várias gerações durante o ano; fácil manejo e reprodução, que reduz os custos em mantê-los; susceptibilidade a mutagênese, o que por sua vez possibilita a realização de estudos genéticos diversos. Após seu genoma ser descrito, constatou-se a semelhança genética de mais de 70% entre humanos e zebrafish, apresentando 12.719 genes em comum (Howe, et al., 2013), tornando possível o estudo de doenças e fenômenos de forma extremamente controlada, com resultados científicos detalhados e relevantes.

Essas características possibilitaram a realização dos mais variados estudos nas últimas décadas. O zebrafish foi utilizado como modelo animal para a criação de outros peixes até estudos de regeneração de tecido nervoso em humanos (Abraham, et al., 2009; Bilota, et al., 2001; De-Sheng, et al., 2013; Li, et al., 2015; Mathur, et al., 2010; Tobia, et al., 2013; Tran & Gerlai, 2014; Vettori, et al., 2011; Wu, 2014).

2.6.1. Reprodução e estrutura ovariana

Os tipos de ovários de peixes estão classificados basicamente em três tipos de acordo com o padrão de desenvolvimento folicular (Wallace & Selman, 1981), sendo eles: síncrono, sincrônico e assincrônico. O tipo síncrono é caracterizado por apresentar uma massa de folículos que cresce, matura e então são ovulados simultaneamente. O ovário do tipo síncrono apresenta pelo menos dois grupos foliculares, em diferentes estágios de maturação, permitindo que esses peixes que geralmente ovulam uma vez por ano possam efetuar mais de uma desova durante o período reprodutivo, pois os oócitos são liberados parcialmente durante períodos de tempo relativamente curtos. E o ovário tipo assíncrono, é representado por folículos que se apresentam em diferentes fases de desenvolvimento, desta forma eles podem ser liberados à medida que se tornam maduros. Estudos histológicos da estrutura ovariana do zebrafish descreveram o ovário do zebrafish como assíncrono (Çakıcı & Üçüncü, 2007; Koç & Akbulut, 2012; Connolly, et al., 2014).

O zebrafish apresenta um par de ovários alongados, o tamanho médio destes varia de acordo com a idade, tamanho do animal e estágio de maturação, chegando a aproximadamente um centímetro quando aptos a desovar. Encontram-se distribuídos bilateralmente entre a parede abdominal e a bexiga natatória. A estrutura é suportada por um mesovário vascularizado. Os oócitos

são conduzidos para o meio externo através de um curto oviduto (Menke, et al., 2011). Via corte histológico é possível a visualização de oócitos em diferentes estágios de maturação agrupados em ninhos, onde os estágios mais jovens dispõem-se centralmente e os mais maduros, de forma gradativa dispõem-se periféricamente (Selman et al., 1993, Connolly, et al., 2014).

Apesar de apresentar os sexos de forma separada (gonocóricos), o zebrafish é classificado como hermafrodita transitório, pois no período larval que vai de 10 a 25 dias pós-fecundação, as gônadas desenvolvem-se inicialmente na forma de ovários (Dranow, et al., 2013). Em aproximadamente metade da população, o tecido ovariano degenera e é tomado por células somáticas, e durante este período as gônadas apresentam características intersexuais, ao final desse estágio, a gônada foi convertida em testículo (Devlin & Nagahama, 2002).

Ao contrário dos mamíferos, que possuem uma quantidade limitada de oócitos a ser ovulado durante a vida do animal, os vertebrados não mamíferos, de alta capacidade reprodutiva e elevada fecundidade, como é o caso do zebrafish, o número de oócitos pode ser infinito (Draper, et al., 2007), pois, as células germinativas mitóticas dessas espécies apresentam características citológicas de oogônias, dessa forma, a formação de oócitos é contínua e por tempo indeterminado (Nakamura, et al., 2011).

2.6.2. Oogênese

As oogônias e oócitos primários em meiose encontram-se agrupados em ninhos, e apresentam-se frequentemente no epitélio luminal do ovário, porém sua origem não pode ser determinada. A proliferação oogonial não é facilmente perceptível nos ovários adultos de zebrafish, e dessa forma também, não é fácil de distinguir ovogônias de oócitos em meiose (na fase precoce leptóteno) utilizando apenas critérios morfológicos. As menores células germinativas, sendo elas oogônias ou oócitos recém-formados, podem ser distintas facilmente a partir das células somáticas no ovário, dado seu grande tamanho e proporção entre citoplasma e núcleo. As células germinativas são geralmente esféricas, com aproximadamente de 20 μm de diâmetro, e ocorrem em ninhos juntamente com outras células germinativas (irmãs).

Segundo Selman e colaboradores (1993), a oogênese do zebrafish pode ser dividida em cinco estágios ou fases. A oogênese inicia com a fase de crescimento primário (fase I), quando o oócito ainda está dentro do ninho, e terminando com a ovulação (fase V).

Estágio I: Estágio de crescimento primário. O complexo oócito/folículo cresce de 7 à 140 μm . Nessa fase os oócitos começam a crescer, e avançam através dos estágios iniciais da prófase, até pararem no diplóteno da primeira divisão meiótica (Hisaoaka, 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 os oócitos estão quiescentes na mesma fase (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 tamanho dos alvéolos corticais acompanham o crescimento do oócito, preenchendo o citoplasma. Dentro do ooplasma, mitocôndrias alongadas permanecem fortemente associadas às cisternas do retículo endoplasmático granuloso, e tornam-se mais numerosas próximas ao córtex. Ocorre formação da tri camada do envelope vitelino. 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, as duas zonas radiatas internas. Pelo início da vitelogênese, o envelope vitelino apresenta 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). Células especializadas que podem ser distinguidas por fibroblastos dentro da teca. As células especializadas da teca ou também chamadas de células intersticiais do ovário foram descritas anteriormente em folículos de zebrafish e acredita-se serem células secretoras de esteróides, com base em observações morfológicas e enzimáticas histoquímicas (Yamamoto et al., 1968; Lambert, et al., 1978). Essas células não são numerosos ou bem desenvolvidos em folículos da fase I, mas a partir da fase II e pelo resto de desenvolvimento, elas aumentam em número e tamanho, e tornam-se mais comuns. Completamente diferenciadas, são encontradas em aglomerados ao lado de capilares dentro da teca. Ultraestruturalmente, as células da 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 através de endocitose e, posteriormente, transformado em proteínas de vitelo que se acumulam no limite da envelope vitelínico (Wallace, et al., 1985). Com o aumento da quantidade de vitelo o envelope vitelínico torna-se progressivamente mais fino e mais eletrodenso enquanto as células da teca especiais continuam a crescer e multiplicar. Células do folículo permanecem cubiformes e o retículo endoplasmático rugoso e lisossomos se proliferam. Dentro do oócito, a vesícula germinal se torna menos

achatada e desenvolve um contorno suave, e perto do fim desta fase, começa a mover-se para longe do ooplasma central. Os nucléolos são reduzidos gradativamente em número e tornam-se menos irregulares em forma, e os menores nucléolos permanecem próximos ao centro da vesícula germinal. Os corpúsculos e o vitelo acumulam-se centralmente dentro do oócito, os alvéolos corticais são progressivamente deslocados para a periferia e partículas de glicogênio tornam-se visíveis dentro do ooplasma. Ao final da vitelogênese, os folículos se tornar competentes para responder aos estímulos hormonais endógenos e são recrutados para a maturação.

Estágio IV: Maturação do oócito. Durante o estágio IV, a meiose é reiniciada, a vesícula germinal migra para a periferia do oócito, o envelope nuclear se rompe, a primeira divisão meiótica ocorre, 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 ao canal pelos poros dos canais do envelope vitelínico, mesmo depois da ovulação. Após a ovulação, em muitos teleósteos, os remanescentes dos folículos tornam-se os folículos pós-ovulatórios e o envelope permanece com o ovo.

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

3.1. A cápsula manufaturada em aço inox pode ser utilizada para vitrificação.

3.2. O micro ambiente proporcionado pela cápsula de metal protege as células de crioinjúrias.

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral:

Avaliar o efeito das soluções crioprotetoras sobre a morfologia dos folículos ovarianos de zebrafish submetidos ao microambiente proporcionado pela cápsula de metal após a criopreservação.

4.2. Objetivos específicos:

Avaliar o efeito das quatro soluções crioprotetoras sobre a integridade dos folículos ovarianos após a criopreservação.

Avaliar o gradiente térmico proporcionado pela estrutura da cápsula de metal;

Avaliar a presença e frequência de alterações na morfologia dos cinco estágios de desenvolvimento dos folículos ovarianos através de análise histológica;

CAPÍTULO II

Artigo elaborado conforme as normas da PPG Zootecnia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MORFOLOGIA DE FOLÍCULOS OVARIANOS DE ZEBRAFISH APÓS CRIOPRESERVAÇÃO UTILIZANDO UMA CÁPSULA DE METAL

¹Itamar Cossina Gomes¹, Lis Santos Marques¹, Danilo Pedro Streit Jr¹.

¹Grupo de pesquisa Aquam, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

RESUMO

O apelo pela conservação ambiental e o significativo aumento no número de organismos cultivados de alto valor genético demandam tecnologias que permitam conservar sua genética, mesmo após a morte do animal. A criopreservação de gametas possibilita a preservação da genética de espécies ameaçadas e de interesse comercial, prolongando sua vida reprodutiva evitando assim a perda de material genético por doenças, catástrofes, transferência de animais ou perda do habitat natural. A criopreservação tem sido aplicada à conservação de ovários e tecido ovariano, no entanto, há muitas controvérsias acerca de qual seria o melhor protocolo a ser utilizado. Tendo isso em vista, o presente estudo teve como objetivo avaliar a morfologia do tecido ovariano de zebrafish criopreservado em cápsula de metal com o uso de diferentes soluções crioprotetoras. As soluções crioprotetoras utilizadas foram: 1,5 M metanol + 4,5 M propileno glicol (SC1); 1,5 M metanol + 5,5 M Me₂SO (SC2); 1,5 M metanol + 4,5 M propileno glicol + 0,5 M sacarose (SC3); 1,5 M metanol + 5,5 M Me₂SO + 0,5 M sacarose (SC4). Após o descongelamento a integridade de cinco estágios de desenvolvimento folicular foi avaliada em cada grupo. A morfologia celular foi observada através de análise histológica. A análise dos dados mostrou que os folículos em estágio I e II foram os melhores criopreservados em todos os grupos experimentais. Sendo que, os grupos SC4 e SC2 foram os que apresentaram os melhores resultados, respectivamente com 88,26% e 84,2% de folículos sem alterações morfológicas. Já os estágios foliculares mais avançados de desenvolvimento (estágios IV e V) apresentaram-se com alterações em todos os grupos. Portanto, apesar do sucesso na criopreservação dos estágios foliculares mais iniciais (I e II) foi possível identificar alterações morfológicas em todos os grupos avaliados. Dentre as principais alterações identificadas estão a aglutinação do citoplasma e enrugamento e ruptura da membrana do envelope celular. Ao avaliar os resultados pode-se concluir que apesar do uso da capsula de metal em associação com as soluções SC4 e SC2 apresentarem os melhores resultados, as soluções SC1 e SC3 também foram eficientes na manutenção da integridade morfológica de folículos imaturos, e portanto essa metodologia pode ser utilizada com sucesso na criopreservação de folículos imaturos.

Palavras-chave: Cápsula de metal, crioinjúrias, criopreservação de ovário, morfologia ovariana, vitrificação, zebrafish.

MORPHOLOGY OF ZEBRAFISH OVARIAN FOLLICLES AFTER CRYOPRESERVATION USING A METAL CAPSULE

Author: Itamar Cossina Gomes

Advisor: Danilo Pedro Streit Jr.

ABSTRACT

The appeal for environmental conservation and the significant increase in the number of cultivated organisms with high genetic value, demand technologies to allow preserve their genetics, even after the death of the animal. The cryopreservation of gametes allow the preservation of genetics of the endangered and commercial species, prolonging their reproductive life. Furthermore, this technology prevents the loss of genetic material caused by diseases, disasters, transfer of animals or loss of natural habitat. The cryopreservation has been applied to the conservation of ovaries and ovarian tissue, however, there are many controversies about what would be the best protocol to use. thus, the aim of this study was to evaluate the morphology of cryopreserved zebrafish ovarian tissue using a metal capsule with four different cryoprotectant solutions. The cryoprotectant solutions used were: 1.5M methanol + 4.5 M propylene glycol (CS1); 1.5M methanol + 5.5 M Me₂SO (CS2); 1.5M methanol + 4.5 M propylene glycol + 0.5 M sucrose (CS3); Methanol + 1.5 M 5.5 M 0.5 M sucrose + Me₂SO (CS4). After heating the integrity of the five stages of follicular development was assessed in each group. Cell morphology was observed by histological analysis. The thermal gradient inside the capsule and the sample was verified by a thermistor Pt500, model Keithley 2001A. The analysis of data show that the follicles stage I and II were cryopreserved better in all experimental groups. the treatments CS4 and CS 2 showed the best results, respectively with 88.26% and 84.2% of follicles without morphological changes in stage I. The most advanced follicular development stages (stages IV and V), showed changes in all treatments. Therefore, despite the successful cryopreservation of follicular early stages (I and II), It was possible to identify morphological changes in all the groups. Among the main changes identified, can be observed agglutination of cytoplasm and rupture of cell and wrinkling of the egg envelope. When evaluating the results it can be concluded that despite the use of the metal capsule in association with the CS4 and CS 2 solutions show the best results, the CS1 and CS3 solutions were also effective in maintaining the morphological integrity of immature follicles, therefore this method can be successfully used in the cryopreservation of immature follicles.

Keywords: Zebrafish, ovarian cryopreservation, vitrification, cryoinjury, metal capsule, ovarian morphology.

Introdução

A criopreservação de folículos e tecido ovariano de peixes é uma ferramenta promissora na preservação de espécies ameaçadas ou de interesse comercial, principalmente pela importância da conservação do genoma materno, em especial por que o DNA mitocondrial e mRNAs são herdados da fêmea. A criopreservação de folículos apresenta vantagens quando comparada a criopreservação de embriões de peixes, pois apresentam ausência de córion completamente formado e menor tamanho, e o que é vantajoso, pois confere maior relação superfície/volume o que otimiza o transporte de água e solutos, aumentando as chances de sobrevivência durante a criopreservação (Tsai, et al., 2009).

Além disso, a criopreservação permite a transferência entre locais e evita a perda genética ocasionada por doenças, catástrofes, predação intensiva ou barreiras artificiais como barragens (Cerdà, et al., 2007; Zhang et al., 2007; Fornari, et al., 2012). Em aquacultura a criopreservação de sêmen está estabelecida, e bem documentada com sucesso em de mais de 200 espécies (Billard & Zhang, 2001; Linhart, et al., 2005; Thirumala, et al., 2006; Streit Jr, et al., 2008; Viveiros & Godinho, et al 2009), no entanto, para oócitos e embriões ainda não foram estabelecidos protocolos de sucesso (Godoy, et al., 2013).

Na tentativa de se obter um protocolo eficiente para a criopreservação de oócitos e embriões tem se utilizado a vitrificação. Essa técnica é atualmente a abordagem dominante para a criopreservação de oócitos e embriões, no entanto, sérias discussões persistem particularmente no que se refere à biossegurança. O principal questionamento é referente ao potencial de contaminação da amostra ao entrar em contato com o nitrogênio líquido. Os sistemas de criopreservação utilizados para a vitrificação são categorizados como “aberto” ou “fechado” de acordo com contato entre o meio e o nitrogênio líquido durante a criopreservação. Os sistemas fechados são caracterizados por manter as amostras fisicamente separadas do nitrogênio durante todo processo de resfriamento, enquanto que os sistemas abertos permitem o contato direto entre o nitrogênio líquido e as amostras (Bielanski, et al., 2009). Diversas são as ferramentas utilizadas na vitrificação, atualmente mais de 15 versões entre sistemas abertos e fechados estão disponíveis comercialmente, várias delas com apenas ligeiras modificações funcionais ou meramente estéticas, como por exemplo as palhetas (OPS). (Vajta, et al., 1998a), o Cryoloop (Lane, et al., 2001; Lane, et al., 1999), e o Cryotop (Hamawaki, et al., 1999).

Todos os sistemas abertos em sua forma original, e a maior parte dos sistemas fechados são claramente modificações desses sistemas abertos. Neste contexto, um recipiente em aço inoxidável, denominado cápsula de metal, foi desenvolvido com o objetivo de aumentar a taxa de resfriamento em um sistema fechado hermeticamente (Aquino, et al., 2014). Esse recipiente, impede o contato do nitrogênio líquido ou vapor com o sistema amostra, o que reduz a possibilidade de contaminação, Os autores afirmaram ter obtido uma taxa de preservação da morfologia de folículos primordiais de (93%) e primários (80%)

bovinos após a vitrificação. Em um estudo prévio utilizando este mesmo recipiente na vitrificação de tecido ovariano de zebrafish, foi registrada uma taxa de 76% folículos imaturos sem alterações após aquecimento e incubação de 24 h (Marques, et al., 2015).

Assim, o objetivo principal foi avaliar a morfologia dos folículos ovarianos de zebrafish após criopreservação de ovários inteiros utilizando uma cápsula de metal hermeticamente fechada.

Materiais e Métodos

Animais

Vinte fêmeas de zebrafish (*Danio rerio*), adultas de aproximadamente seis meses de idade, foram mantidas em aquários de 40 L com sistema de filtragem e aeração, pH 7,2 e temperatura de 27°C, em fotoperíodo de 14/10h (claro/escuro), alimentadas quatro vezes ao dia com alimento para peixes TetraMin (Tetra, Germany).

Os protocolos e procedimentos utilizados neste estudo foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Coleta de ovários

As fêmeas foram eutanasiadas por meio de dose letal de tricaina metano sulfonato (0,6 mg/mL), durante 5 min, então foram decapitadas e os abdômes foram abertos com o auxílio de um bisturi. Após coleta os ovários foram depositados em placas de Petri (35 mm) contendo 90% meio Leibovitz L-15 (pH 9,0) suplementado com L-Glutamina. Os quarenta ovários, média 10 mm de comprimento e 5 mm de largura, foram distribuídos aleatoriamente entre os cinco tratamentos: grupo controle (não criopreservado) e os criopreservados testando quatro soluções crioprotetoras (SC); SC1 (1,5 M de metanol e 4,5 M de propileno glicol), SC2 (1,5 M de metanol e 5,5 M de Dimetil sulfóxido [Me₂SO]), SC3 (1,5 M de metanol, 4,5 M de propileno glicol e 0,5 M de sacarose) e SC4 (1,5 M de metanol, 5,5 M de Me₂SO e 0,5 M de sacarose).

Protocolo de criopreservação

A metodologia utilizada na criopreservação foi uma adaptação de protocolos de vitrificação publicados previamente (Godoy et al., 2013; Aquino et al., 2014; Marques et al., 2015). Todas as soluções foram preparadas em meio Leibovitz L-15 90% (pH 9,0) suplementados com L-Glutamina.

Após a coleta, os ovários foram expostos às soluções de equilíbrio (SE) por 15 min a temperatura ambiente (23±2°C). A SE composta por 1,5 M de metanol associado a 2,75 M de Me₂SO foi utilizada previamente a exposição SC2 e 4. A SE composta de 1,5 M de metanol associado a 2,25 M de propileno

glicol foi utilizada previamente a exposição a SC 1 e 3. Os ovários foram mantidos na solução de vitrificação ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) por 90 segundos. Cada ovário foi transferido com o mínimo volume de SC para uma cápsula de metal, a qual foi submersa em nitrogênio líquido. As cápsulas foram armazenadas por aproximadamente sete dias em botijões de nitrogênio líquido.

Para aquecimento, as cápsulas foram retiradas do botijão de armazenamento e permaneceram em temperatura ambiente por 30s, então a 28°C em banho-maria por 2 min. Com o auxílio de uma pinça os ovários foram transferidos para três soluções de aquecimento ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$), 1 M, 0,5 M e 0,25 M de sacarose, por 1, 3 e 5 min, respectivamente. Após esse procedimento os ovários foram lavados três vezes em meio L-15 90% (pH 9,0). Os ovários frescos do grupo controle foram imediatamente após a coleta lavados em meio L-15 90% (pH 9,0) e, em seguida, fixados para a histologia.

Histologia

Os ovários foram fixados em formol tamponado 10% e processados pela técnica de inclusão em parafina e corados pela hematoxilina-eosina (HE) (Prophet et al., 1992).

Cinco estágios de desenvolvimento foram observados: (I) crescimento primário, (II) cortical-alveolar, (III) vitelogênese, (IV) maturação e (V) maturo (Selman et al., 1993). Pelo menos 100 folículos de cada estágio de desenvolvimento foram avaliados em cada tratamento por repetição.

Gradiente térmico

Os dados de gradiente térmico foram coletados através do termistor Pt500, modelo Keithley 2001. O sensor foi colocado em contato com a amostra, e então a cápsula foi mergulhada em NL, os dados de temperatura foram medidos até que a temperatura interna da amostra atingisse -196°C . A curva de aquecimento foi obtida enquanto a amostra era removida do NL e mergulhada em banho-maria, os valores foram medidos até a temperatura atingir $18,5^{\circ}\text{C}$. Todos os dados de temperatura/tempo foram coletados pelo software do termistor.

Análise estatística

Os dados de quatro repetições (fragmentos ovarianos) por tratamento foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) e aplicado o Teste de Tukey para comparação entre médias, a 5% de significância.

Resultados

Análise histológica

A partir da análise da histologia foi possível avaliar o percentual de folículos íntegros após a criopreservação. Para os folículos em estágio I de desenvolvimento foi possível obter valores próximos a 90% de integridade (Gráfico 1). O Estágio I foi o que apresentou as maiores taxas de folículos morfológicamente íntegros em todos os tratamentos, não havendo diferença significativa ($p>0,05$) entre o grupo controle (97,37%) e os tratamentos SC1 (71,88%), SC2 (84,2%) e SC4 (88,26%). Entretanto houve diferença significativa entre o controle e os tratamentos na preservação do estágio II, as melhores taxas foram observadas nas soluções SC1 (45,62%), SC2 (63,48%) e SC4 (49,6%), novamente. Em relação ao estágio III as soluções SC1 (36,86%) e SC2 (38,37%) foram as que apresentaram os maiores percentuais de folículos íntegros. Nos estágios IV e V verificou-se uma diferença significativa entre o grupo controle e os tratamentos ($p>0,05$), mostrando que a integridade dos estágios mais avançados de desenvolvimento folicular não foram preservados por nenhuma das soluções utilizadas.

Gráfico 1. Percentual (%) de folículos intactos de cinco estágios de desenvolvimento após criopreservação utilizando quatro soluções crioprotetoras (SC).

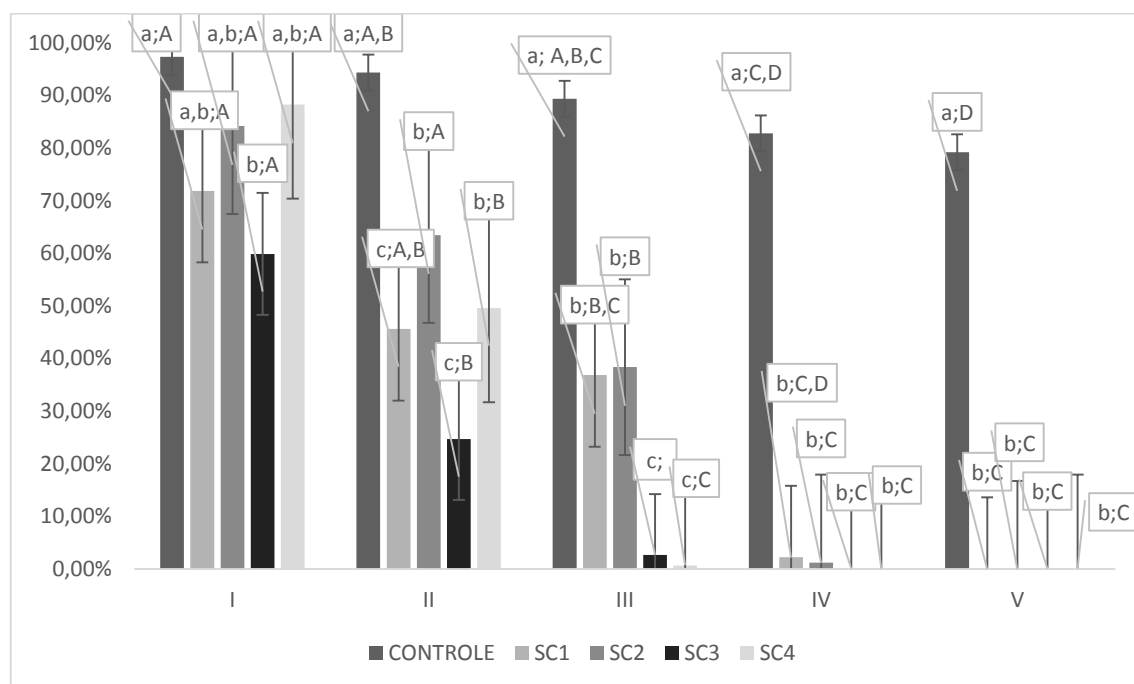


Gráfico 1: Teste de ANOVA seguida de teste de Tukey ($p<0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre estágios de maturação. Controle (ovários frescos), SC1 (1,5 M de metanol e 4,5 M de propileno glicol), SC2 (1,5 M de metanol e 5,5 M de Dimetil sulfóxido [Me₂SO]), SC3 (1,5 M de metanol, 4,5 M de propileno glicol e 0,5M de sacarose) e SC4 (1,5 M de metanol, 5,5 M de Me₂SO e 0,5 M de sacarose).

Inicialmente foi feita a análise dos cortes histológicos do grupo controle, nos quais é possível observar todos os estágios foliculares (Figura 1 A). Em estágio I, os folículos primários ou imaturos apresentam o tamanho menor, vesícula germinal (VG) com núcleos (NC) periféricos corados em rosa e ooplasma em roxo envolvidos apenas por uma camada escamosa de células foliculares distinta da membrana basal, ambas envolvidas pela teca (Figura 1.B). Em estágio II, além de os folículos serem um pouco maiores que os folículos em estágio I, apresentam poucos alvéolos corticais (AC) (Figura 1.B) e a camada granulosa começa a aparecer antes de atingirem o estágio III (Figura 2.C). Em estágio III observa-se células grandes em tamanho, vesícula germinal bem definida, grande número de alvéolos corticais e envelope celular bem definido (Figura 1.D). Em estágio IV, os folículos são um pouco maiores que os folículos em estágio III, entretanto, a vesícula germinal está em migração em direção à periferia celular (Figura 1.E). Em estágio V, a vesícula germinal não é mais notada (Figura 1.C).

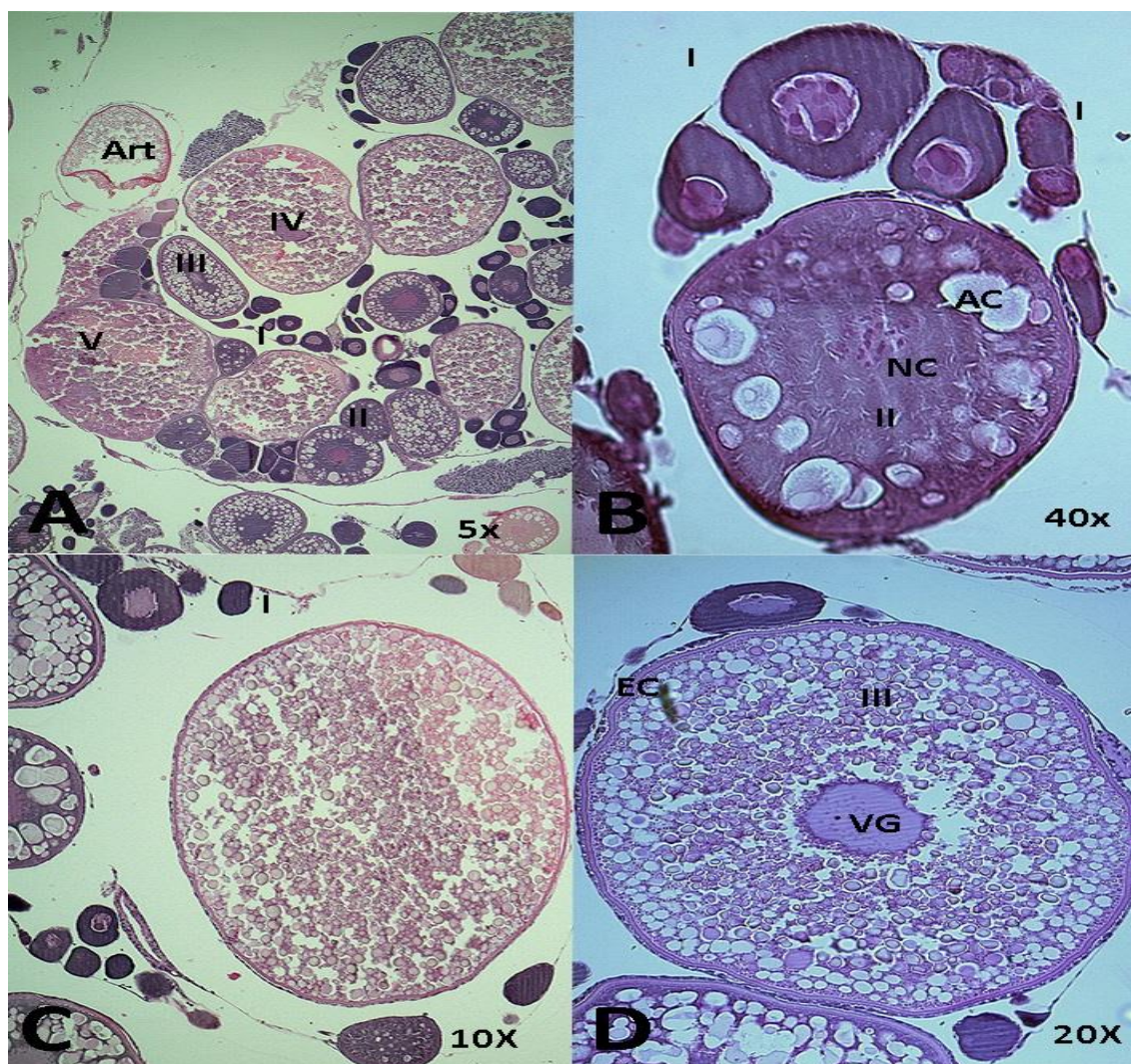
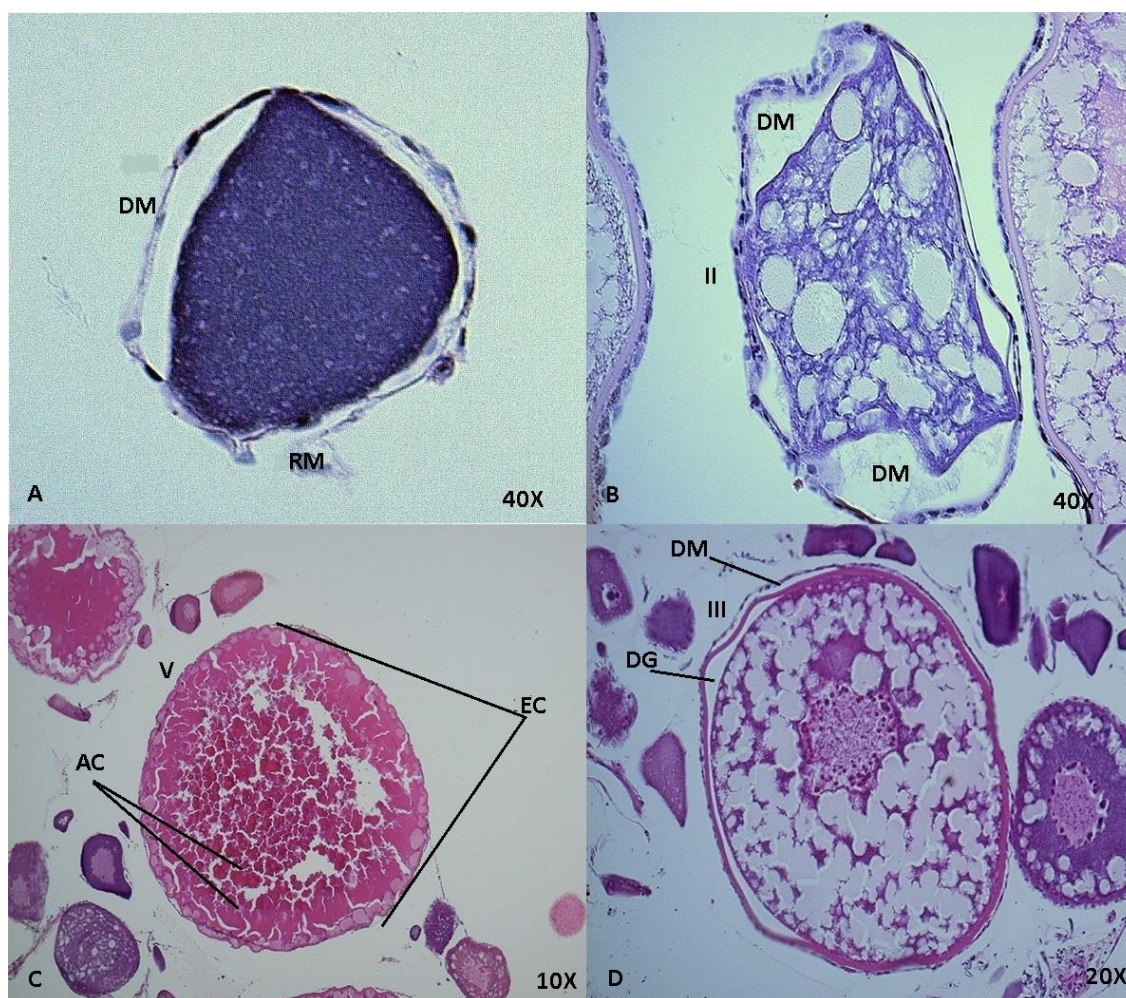


Figura 1: Imagens de cortes histológicos do Grupo controle. A: Visão geral do controle indicando os 5 estágios de maturação dos folículos ovarianos de Zebrafish (*Danio rerio*) a objetiva de 5X. B: Estágios I e II, sem alterações morfológicas de membranas e estruturas internas. Estágios I com núcleos periféricos (NC) visíveis na vesícula germinal, estágio II com primeiros alvéolos corticais (AC) visíveis a objetiva de

40X. C : Estágios I, II, III e V sem alterações a uma objetiva de 10X. D: Estágio III a uma objetiva de 20X com vesícula germinal bem definida e envelope celular (EC) destacado, ambos sem alterações. Art em A indica que a alteração na condição geral do folículo pode ter sido causada durante o processo de confecção da lâmina. Imagens obtidas através do microscópio ZeissScope A1 e câmera AxiocamERc 5

A Figura 2 mostra os grupos submetidos aos quatro tratamentos. De forma geral, os folículos em estágio I apresentam poucas alterações morfológicas, na qual a principal alteração observada é o desprendimento da camada de células foliculares (Figura 2.A). Nos folículos em estágio II, além das alterações na camada externa pode-se notar ruptura dos alvéolos corticais e aglutinação do ooplasma (Figura 2.B). Os folículos em estágio III apresentaram alterações tais como enrugamento do envelope celular (Figura 2.C) e descolamento de membranas do envelope celular (Figura 2. D). Os folículos em estágios IV e V apresentaram as mesmas alterações citadas acima, no entanto, em maior frequência e intensidade (Figura 2. C, E e F).



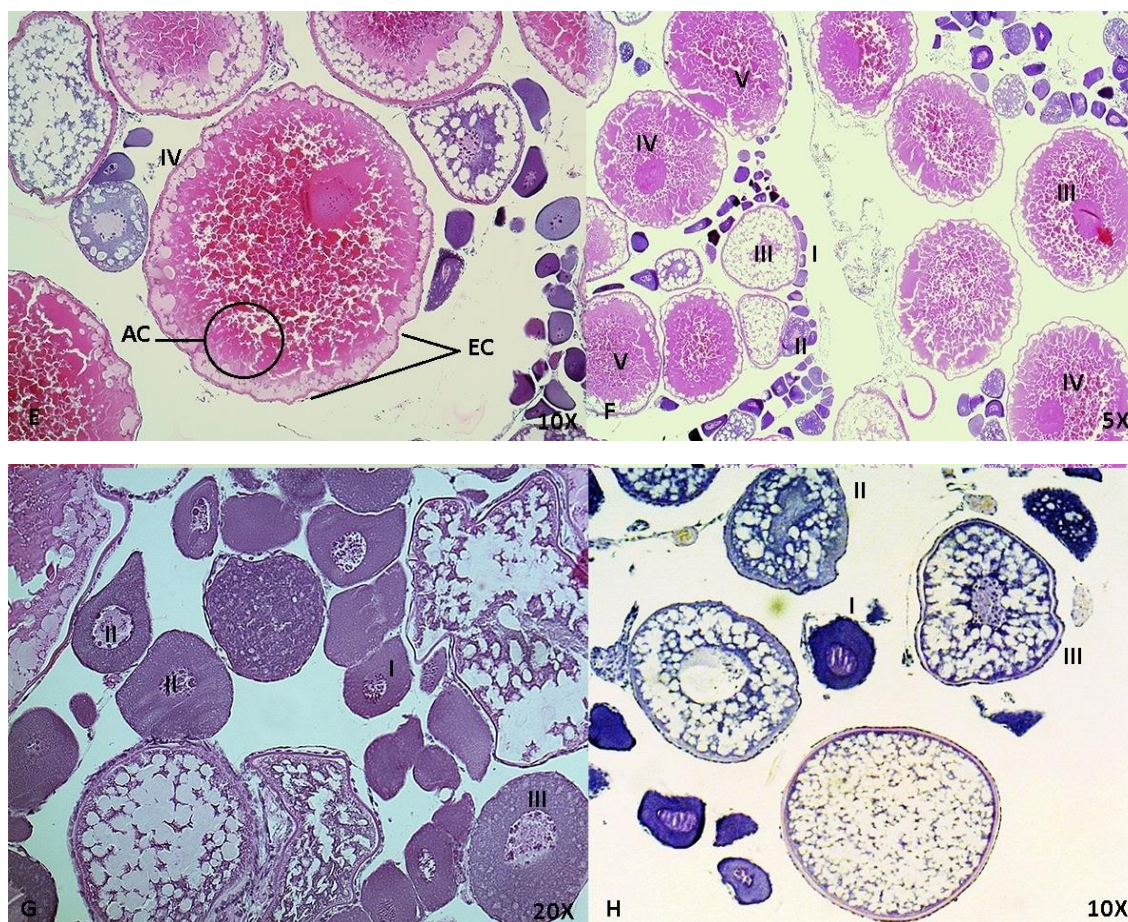


Figura 2: Imagens do cortes histológicos de ovários submetidos aos diferentes tratamentos (SC1, SC2, SC3 e SC4). A: Folículo em estágio I a objetiva de 40X submetido a (SC)1, apresentando (**DM**) descolamento da camada de células foliculares e (**RM**) ruptura da camada de células foliculares. B: Folículo em estágio II a objetiva de 40X submetida a SV2, apresentando **DM** descolamento da camada de células foliculares e aglutinação do ooplasma. C: (SC4) e E (SC3): Folículos em estágio III,IV e V a objetiva de 10X, apresentando (**EC**) enrugamento do envelope celular e no estágio V (**AC**) aglutinação e colapso do ooplasma. D: Folículo em estágio III apresentando (**DG**) descolamento da membrana granulosa e **DM** camada de células foliculares. F: SC3) Visão geral do estado morfológico dos folículos a objetiva de 5X. G: Quadro geral de folículos em estágio I e II submetidos a (SC1) sem alterações aparentes a objetiva de 20X I: Folículos submetidos a (SC2) a objetiva de 10X, apresentando estágios I e II sem alterações aparentes, e estágio III apresentando (**DG**) descolamento da membrana granulosa, camada de células foliculares e ruptura dos alvéolos corticais. Imagens obtidas através do microscópio ZeissScope A1 e câmera AxiocamERc 5.

Gradiente térmico

Para compreender melhor os fenômenos encontrados, como por exemplo indícios da formação de gelo e efeito citotóxico, e ainda um estresse osmótico, buscou-se avaliar de forma mais específica o comportamento termodinâmico da cápsula de metal. Como mostrado no Gráfico 2, após o recipiente ser submergido em NL, a temperatura da amostra caiu de 25,78°C à -196,03°C em 121s, o que condiz com uma queda de 1,83°C/s (109°C/min). Durante o aquecimento em banho-maria a temperatura interna foi elevada de -196,03°C a 18,74°C em 390,8s, o que representa uma velocidade de 0,55°C/s (33°C/min).

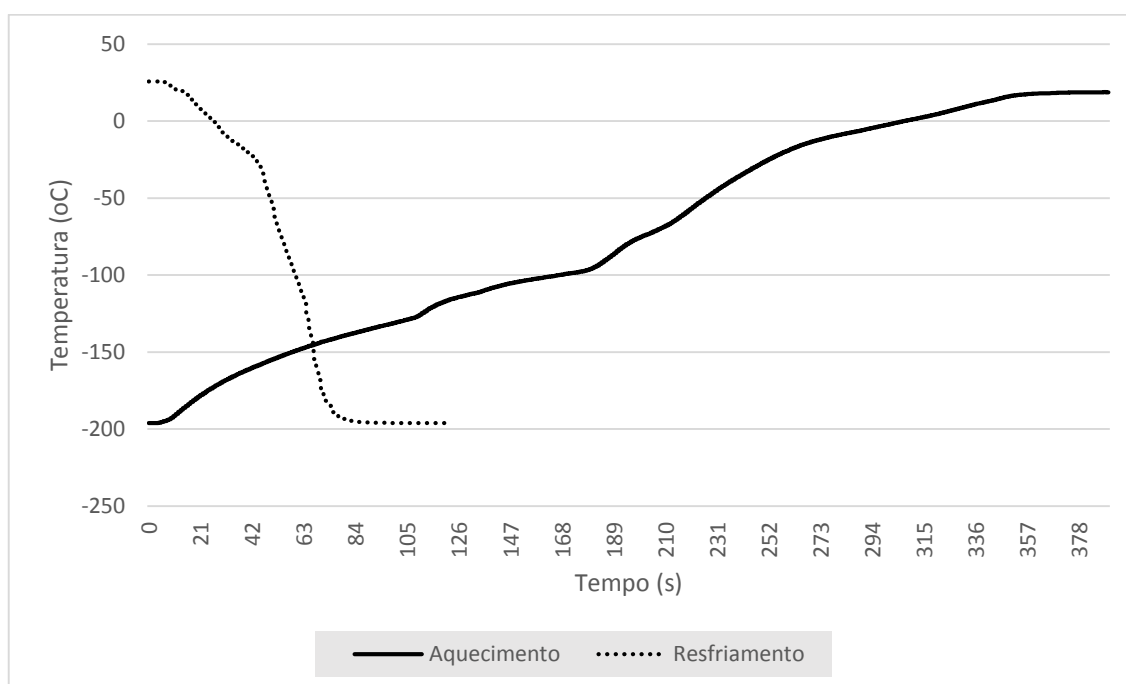


Gráfico 2: Gradiente térmico em graus celsius em função do tempo em segundos (s) durante o resfriamento e o aquecimento da amostra.

Discussão

No presente estudo a análise histológica mostrou não ter havido diferença entre os tratamentos e o controle na morfologia dos folículos em estágio I. Isso é esperado dado que o menor tamanho e volume dos folículos associado à pequena quantidade de lipídios intracitoplasmáticos sensíveis às baixas temperaturas, garante aos folículos imaturos maior tolerância a criopreservação do que os em estágio de desenvolvimento mais avançado. No entanto, os demais estágios de maturação apresentaram alterações morfológicas significativas independente dos tratamentos.

Os folículos criopreservados em estágio II embora com a grande quantidade de folículos íntegros morfológicas (até 63%) aproximadamente, observou-se que em desenvolvimento avançado, mais próximos de atingir o estágio III, tornam-se mais sensíveis a criopreservação, em função de já possuírem quantidades de lipídios e água relativamente maiores. Com os folículos em estágio III, a condição não é tão diferente, porém apresentaram uma alta taxa de alterações morfológicas nas membranas do envelope celular e ooplasma sendo mais intensas e frequentes nos folículos em estágio III avançado. Nos tratamentos SC1 e SC2 resultaram em maior porcentagem de folículos sem alterações morfológicas para o estágio III, não foram acrescidos de sacarose, e esta condição parece ter evitado as alterações morfológicas presentes nos tratamentos SC3 e SC4.

Em todos os tratamentos, os folículos em estágios IV e V, apresentaram intensas alterações morfológicas, tanto no envelope celular, quanto no ooplasma determinando a inviabilidade dos folículos. O maior volume celular, metabolismo elevado, grande quantidade de proteínas e lipídios, maior complexidade e tamanho das estruturas intracelulares, faz com que os folículos em estágios avançados de maturação sejam mais vulneráveis as injúrias. Sendo que a origem das injúrias pode ser, tanto físicas, como a formação de cristais de gelo, quanto químicas, como o efeito tóxico dos agentes crioprotetores, além de serem muito mais vulneráveis ao estresse osmótico e oxidativo.

Nos tratamentos em que 0,5 M de sacarose foi adicionado (SC3 e SC4) houve um aumento significativo de alterações morfológicas nos folículos em estágios III, IV e V. É possível supor que, a sacarose a (0,5 M) pode ter desencadeado um intenso efeito osmótico. A concentração testada de sacarose pode ter interferido no influxo dos crioprotetores permeáveis através do efluxo muito intenso de água, aumentando a frequência e intensidade de alterações morfológicas. Sabe-se que a adição de açúcares e polissacarídeos às soluções crioprotetoras reduzem a curva crítica de resfriamento (Sutton, 1992), uma vez que soluções aquosas de açúcares apresentam altas temperaturas de transição vítrea (T_g) (Kuleshova, et al., 1999). Deste modo, a adição de açúcares, como a sacarose, às soluções crioprotetoras diminui a concentração de crioprotetores necessária para prevenir a formação de gelo durante o resfriamento e aquecimento (Higaki, et al., 2010), conseqüentemente, reduzindo o efeito tóxico dos crioprotetores. No entanto, a T_g é dependente também da velocidade de resfriamento e aquecimento. Se a temperatura do líquido permanece acima da temperatura de fusão (T_f), a cristalização torna-se termodinamicamente favorecida (Fuller&Paynter, 2004). A curva de resfriamento lenta obtida com a cápsula de metal, associada à alta viscosidade das soluções SC3 e SC4, provavelmente não permitiu a formação do estado vítreo sem cristais de gelo. Uma taxa de aquecimento suficientemente rápida poderia evitar o crescimento dos cristais de gelo durante o aquecimento, entretanto, a velocidade obtida com a cápsula foi muito inferior às taxas de aquecimento com resultados satisfatórios ($\geq 1.500^\circ\text{C}/\text{min}$) publicadas na literatura.

Durante a fase de aquecimento há grandes chances de ocorrer o recristalização do gelo intracelular, podendo comprometer a viabilidade celular após a criopreservação. Publicações recentes, em que foram utilizados oócitos murinos evidenciou-se que a taxa de aquecimento é a variável dominante que influencia a sobrevivência no processo de vitrificação (Seki & Mazur, 2008, 2009, 2012; Mazur & Seki, 2011; Jin et al, 2014). Dentre outros fatores, a possível formação de gelo intracelular pode explicar a alta frequência de rompimento das membranas foliculares, fenômeno que já é bem conhecido pelo fato de a cristalização estar fortemente relacionada as alterações em membranas. Este fenômeno provoca perda da permeabilidade e da compartimentação das células, podendo ocasionar o colapso das estruturas das membranas e até mesmo a morte celular.

Nos folículos em estágios IV e V observou-se uma alta ocorrência de enrugamento das membranas e aglutinação do ooplasma, ocorrido principalmente nos tratamentos SC3 e SC4, observou-se uma relativa redução no volume celular, reforçando o indício de um intenso estresse osmótico proporcionado pela sacarose. Como consequência de uma desidratação celular excessiva, há o aumento da concentração de soluto intracelular, que resulta na modificação de pH e da força iônica, que por sua vez promovem alterações nas membranas (Kiltz & Chakravarty, 2001). A reidratação inadequada após a criopreservação das estruturas oocitárias, provavelmente resultaram em espaços formados no interior das células e entre as membranas do envelope celular, em decorrência do estresse osmótico (Kiltz & Chakravarty, 2001) sofrido durante o período de exposição aos tratamentos. E este período relativamente prolongado deve-se às condições que a cápsula de metal proporciona amostra em função da metodologia, dado que estas não foram resfriadas previamente em NL_2 antes da adição das amostras. Neste contexto, provavelmente as taxas de resfriamento e aquecimento, além de aumentarem a formação de gelo intracelular, proporcionaram um maior efeito tóxico (SC1 e SC2) e osmótico (SC3 e SC4) das soluções crioprotetoras, uma vez que os agentes crioprotetores em altas concentrações permaneceram por mais tempo agindo sobre as células.

No entanto a cápsula de metal, juntamente com a metodologia utilizada, foi eficiente como recipiente para a criopreservação de folículos imaturos (estágios I e II) de zebrafish nas condições em que foi utilizada. Porém, não foi obtido sucesso na criopreservação de folículos em estágios mais avançados de desenvolvimento (III, IV e V).

Seguramente, é necessário otimizar a metodologia, talvez com o pré-resfriamento da cápsula, e adequação da solução crioprotetora na expectativa de gerar melhores resultados quanto a criopreservação. Por outro lado, não evitaria o problema com o período de aquecimento, a não ser com a adoção de um equipamento que induzisse um aquecimento intenso e controlado. Quanto a estrutura da cápsula de metal, o aprimoramento da dissipação térmica se faz necessário. A otimização do design da cápsula pode ser obtido através da redução na espessura da parede da cápsula e aumentando a superfície de dissipação térmica. Pesquisadores afirmam que a espessura do material utilizado e o mínimo de volume de solução crioprotetora são fatores essenciais para a aceleração da velocidade de resfriamento (Isachenko, et al., 2003; Kuwayama, et al., 2007).

Concluimos que independente das curvas de resfriamento e aquecimento terem sido insatisfatórias, a cápsula de metal combinada com o protocolo das soluções utilizadas preservou morfolologicamente os folículos imaturos de zebrafish. Os resultados do nosso estudo irá auxiliar em pesquisas futuras buscando elaborar um protocolo de sucesso na criopreservação de tecido ovariano de peixes. A criopreservação de tecido é uma alternativa promissora na criopreservação do material genético de fêmeas.

Referências Bibliográficas

Referências

1. AQUINO, D. et al. Ovarian tissue vitrification: the use of a novel metal closed system for clinical grade cryopreservation. **Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida**, São Paulo, v.18, n.1, p.12-15, 2014.
2. BIELANSKI A. A review of the risk of contamination of semen and embryos during cryopreservation and measures to limit cross-contamination during banking to prevent disease transmission in ET practices. **Theriogenology**, Los Altos, v. 77, n. 3, p. 467-482, 2012.
3. BOS-MIKICH, A. et al. The use of a metal container for vitrification of mouse ovaries, as a clinical grade model for human ovarian tissue cryopreservation, after different times and temperatures of transport. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, Amsterdam, v.29, n.11, p.1267-1271, 2012.
4. CERDÀ, J.; FABRA, M.; RALDÚA, D. Physiological and molecular basis of fish oocyte hydration. In: BABIN, P.J.; CERDÀ, J.; LUBZENS, E. (Ed.). **The fish oocyte: From basic studies to biotechnological applications**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 349-396.
5. COBO A. et al. New options in assisted reproduction technology: the Cryotop method of oocyte vitrification. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 17, n. 1, P. 68-72, 2008.
6. COBO A. et al. Oocyte cryopreservation for donor egg banking. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 23, n. 3, p. 341-346, 2011.
7. FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fisheries and Aquaculture Department. **World aquaculture 2010**. Roma, 2011.
8. FORNARI, D. C. et al. Increasing storage capability of pacu (*Piracatusmesopotamicus*) embryos by chilling : development of a useful methodology for hatcheries management. **CryoLetters**, Luton, v.33, p. 87-96, 2012.
9. FULLER, B. PAYNTER, S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. **Reproductive Biomedicine Online**, Cambridge, v. 9, n. 6 p. 680-91, 2004.

10. GODOY, L. C. et al. A study on the vitrification of stage III zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. **Cryobiology**, Rockville, v.67, n.3, p.347-354, 2013.
11. HAGEDORN, M. et al. First frozen repositories for the Great Barrier Reef coral created. **Cryobiology**, Rockville, v. 65, n. 2, p. 157-158, 2012.
12. HIGAKI, S. et al. Cryopreservation of primordial germ cells by rapid cooling of whole Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. **The Journal of Reproduction and Development**, Tokio, v. 56, n. 2, p. 212-218, 2010.
13. ISACHENKO, E. et al. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 6, p. 191–200, 2003.
14. JIN, B.; KLEINHANS, F.W.; MAZUR, P. Survivals of mouse oocytes approach 100% after vitrification in 3-fold diluted media and ultra-rapid warming by an IR laser pulse. **Cryobiology**, Rockville, v. 68, n. 3, p. 419–430, 2014.
15. KULESHOVA, L.; MACFARLANE, D.; TROUNSON, A.; Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. **Cryobiology**, Rockville, v. 38, p. 119-130, 1999.
16. KULTZ D, CHAKRAVARTY D. Maintenance of genomic integrity in mammalian kidney cells exposed to hyperosmotic stress. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 130, n.3, p. 421–428, 2001.
17. KUWAYAMA M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. **Theriogenology**, Los Altos, v. 67, p. 73–80, 2007.
18. MARQUES L. S. et al. Viability of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles after vitrification in a metal container. **Cryobiology**, Rockville, v. 71, e. 3, p. 367-373, 2015.
19. MAZUR, P.; SEKI, S. Survival of mouse oocytes after being cooled in a vitrification solution to -196°C at 95 °C to 70,000 °C/min and warmed at 610 °C

to 118,000 °C/min: a new paradigm for cryopreservation by vitrification. **Cryobiology**, Rockville, v. 62, p. 1–7, 2011.

20. PARMEGIANI, L. et al. Sterilization of liquid nitrogen with ultraviolet irradiation for safe vitrification of human oocytes or embryos. **Fertility and Sterility**, New York, v.94, n.4, p.1525-1528, 2010.
21. PROPHET, E. B. et al. Laboratory Methods in Histotechnology: **American Registry of Pathology**, Washington, p. 279, 1992.
22. RALL, W. F.; FAHY, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. **Nature**, London, v. 24, p. 387-402, 1985.
23. RAWSON, D. M.; MCGREGOR REID, G.; LLOYD, R. E. Conservation rationale, research applications and techniques in the cryopreservation of lower vertebrate biodiversity from marine and freshwater environments. **International Zoo Yearbook**, London, v. 45, p. 1-16, 2011.
24. REID, G McG.; HALL, H. Reproduction in fishes in relation to conservation. In: HOLT, W. et al. (Ed.). **Reproductive science and integrated conservation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2003. p. 375-393
25. REID, G. McG.; HALL, H. Reproduction in gishes in relation to conservation. In: HOLT, W. et al. (Ed.). **Reproductive science and integrated conservation**. Cambridge University Press, 2003. P. 375-93^[E1].
26. RESENDE, E.K. et al. Melhoramento animal no Brasil: uma visão crítica espécies aquáticas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 8., 2010, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM, 2010.
27. SEKI, S.; MAZUR, P. Effect of warming rate on the survival of vitrified mouse oocytes and on the recrystallization of intracellular ice, **Biology of Reproduction**, Champaign, v 79, n.7, p. 727–737, 2008.
28. SEKI, S.; MAZUR, P. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. **Cryobiology**, Rockville, v. 59, p. 75–82, 2009.

29. SEKI, S.; MAZUR, P. Ultra-rapid warming yields high survival of mouse oocytes cooled to – 196°C in dilutions of a standard vitrification solution. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 4, p. e36058, 2012.
30. SELMAN, K. et al. Stages of oocyte development in the zebrafish *Brachio rerio*. **Journal of Morphology**, Philadelphia, v.218, p.203–224, 1993.
31. SUTTON, R. Critical cooling rates for aqueous cryoprotectants in the presence of sugars and polysaccharides. **Cryobiology**, Rockville, v. 29, p. 585-598, 1992.
32. TSAI, S.; RAWSON, D. M.; T. Development of cryopreservation protocols for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles using controlled slow cooling. **Theriogenology**, Stoneham, v. 71, p. 1226-1233, 2009.
33. VAJTA, G. et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 51, n.1, p. 53–58, 1998.
34. VAJTA, G.; RIENZI, L.; UBALDI, F. M. Open Versus Closed Systems for vitrification of human oocytes and embryos. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 30, p.325–333, 2015.
35. ZHANG, T. et al. Low-temperature preservation of fish gonad cells and oocytes. In: BABINS, P. J.; CERDÀ, J.; LUBZENS, E. (Ed.). **The fish oocyte: from basic studies to biotechnological applications**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 411-436

CAPITULO III

1. CONCLUSÕES

De acordo com a curva de resfriamento indica que houve um congelamento rápido não controlado, no entanto o comportamento termodinâmico da cápsula juntamente com o protocolo utilizado, mostrou-se eficiente quanto a preservação das características morfológicas dos folículos em estágios primários de desenvolvimento.

A adição de sacarose nos tratamentos (SC3 e SC4), exerceu efeito negativo sobre a preservação das características morfológicas dos folículos criopreservados, indicando que a combinação de agentes crioprotetores utilizados tem grande efeito citotóxico sobre os folículos em estágio avançados de maturação. Contudo, há a necessidade de se realizar estudos que definam a solução crioprotetora adequada ao recipiente e ao tipo de tecido a ser criopreservado.

2. PERSPECTIVAS FUTURAS

O uso da cápsula de metal em associação com as diferentes soluções de criopreservação mostrou-se eficiente ao preservar as características morfológicas dos folículos imaturos submetidos a criopreservação. Portanto, tanto a cápsula de metal quanto qualquer uma das soluções crioprotetoras podem ser utilizadas com segurança para criopreservá-los, entretanto ainda não há uma metodologia capaz de criopreservar com eficiência todos os estágios de desenvolvimento folicular, assim como protocolos de maturação de oócitos nesses estágios iniciais, dessa forma, além de se aumentar as taxas de sobrevivência pós criopreservação de tecido ovariano, se faz necessária a realização de mais estudos que possibilitem o desenvolvimento de um protocolo para a maturação de oócitos. Sendo assim será possível comprovar se esses oócitos em estágios I e II criopreservados podem ser maturados, incubados e gerar embriões normais. O insucesso obtido para a criopreservação dos estágios avançados de maturação (III, IV e V), indicam que há a necessidade da realização de mais estudos que padronizem o protocolo de acordo com o comportamento termodinâmico da cápsula de metal, possibilitando assim a utilização adequada deste recipiente.

A otimização do projeto da cápsula de metal, com a redução do volume máximo suportado, e a ampliação da superfície de dissipação térmica, poderia render melhores resultados quanto as curvas de resfriamento e aquecimento esperadas. São promissoras as expectativas, tratando-se de um equipamento esterilizável, de fechamento hermético, que possibilita fácil manuseio, abertura e fechamento seguros, dado que deve-se priorizar, além da segurança das amostras, também a de quem as manuseia.

REFERÊNCIAS

1. 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.
2. ARAV, A.; ZVI, R. Do chilling injury and heat stress share the same mechanism of injury in oocytes? **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 282, n. 1-2, p. 150-152. 2008.
3. ABDELHAFEZ, F. et al. Vitrification in Open and Closed Carriers at Different Cell Stages: Assessment of Embryo Survival, Development, DNA Integrity and Stability During Vapor Phase Storage for Transport. **BMC Biotechnology**, London, p. 11-29, 2011.
4. ABRAHAM, E. et al. The Zebrafish as a Model System for Forebrain GnRH Neural Development. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v.164, p. 151-160, 2009.
5. 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, p. 223-232, 2013.
6. ALMODIN, C.G. et al. Embryo Development and Gestation Using Frsh and Vitrified oocytes. **Human Reproduction**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 1192-1198, 2010.
7. AMORIM, C.A. et al. Vitrification of Human Ovarian Tissye: Efect of Diferent Solutions and Procedures. **Fertility and Sterility**, New York, v. 95, p. 1094-1097, 2011.
8. AQUINO, D. et al. Ovarian Tissue Vitrification: The Use of a Novel Metal Closed System for Clinical Grade Cryopreservation. **JBRA Assisted Reproduction**, Brasília, v. 18, p. 12-15, 2014.
9. AQUINO, D. et al. Ovarian Tissue Vitrification: The Use of a Novel Metal Closed System for Clinical Grade Cryopreservation. **JBRA Assisted Reproduction**, Brasília, v. 18, p. 12-15, 2014.
10. ARAV, A. Cryopreservation of Oocytes and Embryos. **Theriogenology**, Los Altos, v. 81, p. 96-102, 2014.
11. ARMITAGE, W.J., Cryopreservation of Animal Cells. In: TEMPERATURE and animal cells. [S.l.]: SEB. 1987. p. 379-393

12. AXELORD, H. R.; SCHULTZ, L. P. **A Handbook of Tropical Aquarium Fishes**. New York: McGraw-Hill, 1955.
13. AYE, M. et al. Assessment of the Genotoxicity of Three Cryoprotectants Used for Human Oocyte Vitrification: Dimethyl Sulfoxide, Ethylene Glycol and Propylene Glycol. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 7, p. 1905-1912, 2010.
14. BAUDOT, A.; ODAGESCU, V. Thermal Properties of Ethylene Glycol Aqueous Solutions. **Cryobiology**, Rockville, V. 48, n. 3, p. 283-294, 2004.
15. BELOUS, A. M; GRISHENKO, V. I. **Cryobiology**. Kyiv: Naukova Dumka Press, 1994.
16. BIANCHI, V. et al. Meiotic Spindle Imaging in Human Oocytes Frozen With a Slow Freezing Procedure Involving High Sucrose Concentration. **Human Reproduction**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 1078-1083, 2005.
17. BIANCHI, V. et al. Differential Sucrose Concentration During Dehydration (0.2 mol/l) and Rehydration (0.3 mol/l) Increases the Implantation Rate of Frozen Human Oocytes. **Reproductive Biomedicine Online**, Cambridge, v. 14, n. 1, p. 64-71, 2007.
18. BIELANSKI, A.; VAJTA, G. Risk of Contamination of Germplasm During Cryopreservation and Cryobanking in IVF units. **Human Reproduction**, Oxford, v. 24, p. 2457-2467, 2009.
19. BIELANSKI, A. A Review of the Risk of Contamination of Semen and Embryos During Cryopreservation and Measures to Limit Cross-contamination During Banking to Prevent Disease Transmission in ET Practices. **Theriogenology**, Los Altos, v. 77, n, 3, p. 467-482, 2012.
20. BILLARD, R.; ZHANG, T. **Technique of Genetic Resources Banking Fish**. London: Taylor & Francis, 2001.
21. BODIN, S. et al. Integrin-dependent of Lipid Rafts With the Actin Cytoskeleton in Activated Human Platelets. **Journal of Science and Therapy**, Los Angeles, v. 118, n. 4, p. 759-769, 2005.
22. BO-JIN.; KLEINHANS, F.W.; MAZUR, P. Survivals of Mouse Oocyte Approach 100% After Vitrification in 3-fold Diluted Media and Ultra-rapid Warming by na IR Laser Pulse. **Cryobiology**, Rockville, v. 68, p. 419-430, 2014.
23. BONETTI, A. et al. Ultrastructural Evaluation of Human Metaphase II Oocytes after Vitrification: Closed Versus Open Devices. **Fertility and Sterility**, New York, v. 95, p 929-935, 2011.

24. BORINI, A. et al. Clinical Outcome of Oocyte Cryopreservation After Slow Cooling With a Protocol Utilizing a High Sucrose Concentration. **Human Reproduction**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 512-517, 2005.
25. 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, p. 254-260, 1995.
26. BOS-MIKICH, A. et al. The use of a metal container for vitrification of mouse ovaries, as a clinical grade model for human ovarian tissue cryopreservation, after different times and temperatures of transport. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, Amsterdam, v. 29, n. 11, p. 1267-1271, 2012.
27. ÇAKICI, O.; ÜÇÜNCÜ, S. I. Oocyte Development in the Zebrafish, *Danio rerio* (Teleostei: Cyprinidae). **Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Faisalabad, v. 24, n. 1-2, p. 137–141, 2007.
28. 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.
29. CERDÀ, J.; FABRA, M.; RALDÚA, D. Physiological and Molecular Basis of Fish Oocyte Hydration. In: BABIN, P. J.; CERDÀ, J.; LUBZENS, E. (Ed.). **The Fish Oocyte: from basic studies to biotechnological applications**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 349-396
30. CHEN, H. I. et al. Cryovial with partial membrane sealing can prevent liquid nitrogen penetration in submerged storage. **Cryobiology**, Rockville, v. 53, n. 2, p. 283-7, 2006.
31. CHIAN, R.C. et al. Obstetric outcomes following vitrification of in vitro and in vivo matured oocytes. **Fertility and Sterility**, New York, v. 91, p. 2391–2398, 2009.
32. 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
33. COBO, A. et al. New options in assisted reproduction technology: the Cryotop method of oocyte vitrification, **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 17, p. 68–72, 2008.
34. COBO ,A. et al. Oocyte cryopreservation for donor egg banking. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v.23, n. 3, p. 341-346, 2011.

35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. DONG, Q.; HILL, D.; VANDEVOORT, C. A. Interactions among pre-cooling, cryoprotectant, cooling, and thawing for sperm cryopreservation in rhesus monkeys. **Cryobiology**, Rockville, v .59, n. 3, p. 268-274, 2009.
41. DRANOW, D. B.; TUCKER, R. P.; DRAPER, B. W. Germ cells are required to maintain a stable sexual phenotype in adult zebrafish. **Developmental biology**, New York, v. 376, n. 1, p. 43-50, 2013.
42. DRAPER, B. W.; MCCALLUM, C. M.; MOENS, C. B. Nanos1 is required to maintain oocyte production in adult zebrafish. **Developmental Biology**, New York, v. 305, n. 2, p. 589-598, 2007.
43. EBERTZ, S. L.; MCGANN, L. E. Cryoprotectant permeability parameters for cells used in a bioengineered human corneal equivalent and applications for cryopreservation. **Cryobiology**, Rockville, v. 49, n. 2, p. 169-180, 2004.
44. 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.
45. FAHY, G. M. et al. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. **Cryobiology**, Rockville, v. 48, n. 1, p. 22-35, 2004.
46. FAHY, G. M. Cryoprotectant toxicity neutralization. **Cryobiology**, Rockville, v.60, n.3, p.45-53, 2010.

47. FAHY, G. M. Theoretical considerations for oocyte cryopreservation by freezing. **Reproductive Biomedicine Online**, Cambridge, v. 14, n. 6, p. 709-714, 2007.
48. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fisheries and Aquaculture Department. **World aquaculture 2010**. Rome, 2011.
49. FATEHI, R. et al. Effect of ovarian tissue vitrification method on mice preantral follicular development and gene expression. **Theriogenology**, Los Altos, v. 81, p. 302-308, 2014.
50. 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**, Luton, v. 34, n. 3, p. 228-238, 2013.
51. FINK, A. L. Effects of Cryoprotectants on Enzyme Structure. **Cryobiology**, Rockville, v. 23, p. 28-37, 1986.
52. FORNARI, D.C. et al. Increasing Storage Capability of Pacu (*Piracatus mesopotamicus*) Embryos by Chilling: Development of a Useful Methodology for Hatcheries Management. **CryoLetters**, Luton, v. 33, p. 125-133, 2012.
53. 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, p. 779-789, 2014.
54. GALIGUIS, J. et al. Birth of a domestic cat kitten produced by vitrification of lipid polarized in vitro matured oocytes. **Cryobiology**, Rockville, v. 68, n. 3, p. 459-466, 2014.
55. GARCIA, J.I.; NORIEGA-PORTELLA, L.; NORIEGA-HOCES, L. Efficacy of oocyte vitrification combined with blastocyst stage transfer in an egg donation program. **Human Reproduction**, Oxford, v. 26, p. 782-790, 2011.
56. GIRAUD, M. N. et al. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. **Human Reproduction**, Oxford, v. 15, p. 2160-2164, 2000.
57. GODOY, L. C. et al. A study on the vitrification of stage III zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. **Cryobiology**, Rockville, v.67, n.3, p.347-354, 2013.

58. 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, n. 4, p.1396-1404, 2008.
59. 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.
60. GROUT, B.W., MORRIS, G.J. Contaminated liquid nitrogen vapour as a risk factor in pathogen transfer. **Theriogenology**, Los Altos, v. 71, p. 1079–1082, 2009.
61. GUAN, M.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes by vitrifications. **CryoLetters**, Luton, v. 31, p. 230-238, 2010.
62. 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**, France, v. 7, n. 2, p 175-187, 2001.
63. 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, p. 562-571, 2016.
64. GUTNISKY, C. et al. Evaluation of the Cryotech Vitrification Kit for bovine embryos. **Cryobiology**, Rockville, v. 7, p. 391–393, 2013.
65. HAGEDORN, M. et al. First frozen repository for the Great Barrier Reef coral created. **Cryobiology**, Rockville, v. 65, p. 157-158, 2012.
66. HAMAWAKI, A.; KUWAYAMA, M.; HAMANO, S. Minimum volume cooling method for bovine blastocyst vitrification. **Theriogenology**, Los Altos, v. 51, p. 165, 1999.
67. HAWKINS, A. E. et al. Hepatitis B nucleotide sequence analysis: linking an outbreak of acute hepatitis B to contamination of a cryopreservation tank. **Journal of Virological Method**, Amsterdam, v. 60, n. 1, p. 81-88, 1996.
68. HIGAKI, S. et al. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by vitrification of yolk-intact and yolk-depleted embryos using various cryoprotectant solutions. **Cryobiology**, Rockville, v. 67, p. 374-382, 2013.
69. HISAOKA, K. K.; FIRLIT, C. F. The localization of nucleic acids during oögenesis in the zebrafish. **Developmental Dynamics**, New York, v. 110, n. 3, p. 203-215, 1962.

70. HORNICK, J. E. et al. Isolated primate primordial follicles require a rigid physical environment to survive and grow in vitro. **Human Reproduction**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 1801-1810, 2012.
71. 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.
72. HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, Rockville, v.46, n.3, p.205–229, 2003.
73. 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.
74. ISACHENKO, V. et al. Human ovarian tissue vitrification versus conventional freezing: morphological, endocrinological, and molecular biological evaluation. **Reproduction**, Cambridge, v.138, n.2, p.319–327, 2009.
75. ISACHENKO, V. et al. Lipolysis and ultrastructural changes of intracellular lipid vesicles after cooling of bovine and porcine GV-oocytes. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, Berlin, v.30, n.6, p.333-338, 2001.
76. ISACHENKO, V. et al. Effective method for in vitro culture of cryopreserved human ovarian tissue. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 13, p. 228–234, 2006.
77. ISAYEVA, A.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. **Cryobiology**, Rockville, v. 49, n. 2, p. 114-122, 2004.
78. 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.
79. 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.
80. 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**, Bologna, v. 20, n.2, p. 415-424, 1988.

81. KOÇ, N. D.; AKBULUT, C. Electron and Light Microscopic Investigations of Follicular Epithelium in Vitellogenic Oocyte of Zebrafish (*Danio rerio*). **Pakistan Journal of Zoology**, Lahore, v.44, n.6, p.1581-1586, 2012.
82. 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.
83. KULESHOVA, L. L.; SHAW, J. M. A strategy for rapid cooling of mouse embryos within a double straw to eliminate the risk of contamination during storage in liquid nitrogen. **Human Reproduction**, Oxford, v. 15, p. 2604–2609, 2000.
84. KUWAYAMA, M. et al. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 11, n. 15, p. 608–614, 2005.
85. LAMBERT, J.G.D. Steroidogenesis in the ovary of Bruchydanio rerio (Teleostei). In: GAILLARD, P.J.; BOER, H.H. (Ed.). **Comparative Endocrinology**. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1978. p. 65-68
86. LANE, M.; SCHOOLCRAFT, W.B.; GARDNER, D.K. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop containerless technique. **Fertility and Sterility**, New York, v. 72, p. 1073–1078, 1999.
87. LANE, M.; GARDNER, D.K. Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. **Molecular Reproduction Development**, New York, v.58, 342–347, 2001.
88. LARMAN, M.G.; GARDNER, D.K. Vitrification of mouse embryos with super-cooled air. **Fertility and Sterility**, New York, v. 95, p. 1462–1466, 2011.
89. LATTMAN, E. E.; FIEBIG, K. M.; DILL, K. A. Modeling compact denatured states of proteins. **Biochemistry**, Washington, v. 33. n. 20, p. 6158-6166, 1994.
90. LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. **Aquaculture**, New York, v. 269, n. 1-4, p. 1-20, 2007.
91. LI, J.; CHEN, Z.; GAO, L-Y.; 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.

92. LIN, L; YU, Y; YANG, H.; et al. Aseptic minimum volume vitrification technique for porcine parthenogenetically activated blastocyst. **Cryo Letters**, London, v.32, n.1, p.62-68, 2011.
93. LINHART, O. et al. Cryopreservation of european catfish *Silurus glanis* sperm: Sperm motility, mobility, and hatching success of embryos. **Cryobiology**, New York, v. 51, p. 250-261, 2005.
94. 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**, New Zeland, v. 213, p. 1967-1975, 2010.
95. 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**, New Zeland, v. 86, p. 1091–1098, 2010
96. LU, X. L. et al. Effects of varying tissue sizes on the efficiency of baboon ovarian tissue vitrification. **Cryobiology**, Rockville, v. 69, n. 1, p. 79-83, 2014.
97. LUVONI, G. C. Gamete cryopreservation in the domestic cat. **Theriogenology**, Los Altos, v. 66, n. 1, p. 101–111, 2006.
98. LUYET, B. J.; GEGENIO, P. M. Life and death at low temperatures. **Biodynamica**, Normandy, p. 356, 1940.
99. MALONE, T.E.; AND 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.
100. MARQUES, L.S. et al. Viability of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicle after vitrification in a metal container. **Cryobiology**, Rockville, v. 71, p. 367-373, 2015.
101. MARTINÉZ-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.
102. MATHUR, P.; GUO, S. Use of zebrafish as a model to understand mechanisms of addiction and complex neurobehavioral phenotypes. **Neurobiology of Disease**, Oxford, v. 40, p. 66-72, 2010.

103. MAZOOCHI, T. et al. Morphologic, ultrastructural, and biochemical identification of apoptosis in vitrified-warmed mouse ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, New York, v. 90, n. 4, p. 1480-1486, 2008.
104. MAZUR, P.; SEKI, S. Survival of mouse oocytes after being cooled in a vitrification solution to -196 degrees C at 95 degrees to 70,000 degrees C/min and warmed at 610 degrees to 118,000 degrees C/min: a new paradigm for cryopreservation by vitrification. **Cryobiology**, Rockville, v. 62, p. 1–7, 2011.
105. MAZUR, P.; RALL, W. F.; LEIBO, S. P. Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova. Influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability. **Cell Biophysics**, London, v.6, n. 3, p. 197-213, 1984.
106. MCBURNIE, L. D.; BARDO, B. Validation of sterile filtration of liquid nitrogen. **Pharmaceutical Technology North America**, Duluth, v. 26, n. 10, p. 74–82, 2002.
107. 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.
108. MÉNÉZO, Y. et al. Freezing cocultured human blastocysts. **Fertility and Sterility**, New York, v. 58, n. 5, p. 977-980, 1992.
109. MERINO, O. et al. Fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa cryoprotectant-free vitrification: stability of mitochondrion as criterion of effectiveness. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 124, n. 1-2, p. 125-131, 2011.
110. MUKAIDA, T.; OKA, C. Vitrification of oocytes, embryos and blastocysts - review article. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, Amsterdam, v. 26, n. 6, p. 789-803, 2012.
111. MULDREW, K.; MCGANN, L. E. The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. **Biophysical Journal**, Maryland Heights, v. 66, n. 2, p. 532-541, 1994.
112. MUSA, M. A.; KRISHEN J. R.; MCANDREW, B.J. Effect of cryoprotectants on Activity of Selected Enzymes in Fish Embryos. **Cryobiology**, Rockville, v. 32, p. 92-104, 1995.
113. 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.

114. 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.
115. PANAGIOTIDIS, Y. et al. Open versus closed vitrification of blastocysts from an oocyte-donation programme: a prospective randomized study. **Reproductive Biomedicine Online**, Cambridge, v. 26, p.470– 476, 2013.
116. PAPTAEODOROU, A. et al. Open versus closed oocyte vitrification system: a prospective randomized siblingooocyte study. **Reproductive Biomedicine Online**, Cambridge, v. 26, p. 595–602, 2013.
117. PARMEGIANI, L.; VAJTA, G. Contamination of single-straw carrier for vitrification. **Fertility and Sterility**, New York, v. 95, p. 69, 2011.
118. PARMEGIANI, L. et al. Sterilization of liquid nitrogen with ultraviolet irradiation for safe vitrification of human oocytes or embryos. **Fertility and Sterility**, New York, v. 94, n. 4, p. 1525-1528, 2010.
119. PARMEGIANI, L.; COGNIGNI, G.E.; FILICORI, M. Vitrification carriers and European regulation. **Fertility and Sterility**, New York, v. 97, n. 5, P. 27, 2012.
120. POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKERS, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, London, v. 164, p. 666, 1949.
121. PRASAD, T. K. Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. **The Plant Journal**, Oxford, v. 10, p. 1017-1026, 1996.
122. RALL, W. F.; FAHY, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. **Nature**, London, v. 24, p. 387-402, 1985.
123. RALL, W.F. et al. Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. **Journal of Reproduction & Fertility**, Cambridge, v. 80, p. 499–504, 1987.
124. RAUEN, U. et al. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 13, e. 1, p. 155-168, 1999.

125. RAWSON, D. M.; MCGREGOR REID, G.; LLOYD, R. E. Conservation rationale, research applications and techniques in the cryopreservation of lower vertebrate biodiversity from marine and freshwater environments. **International Zoo Yearbook**, London, v. 45, p. 1-16, 2011.
126. REID, G. McG.; HALL, H. Reproduction in fishes in relation to conservation. In: HOLT, W. et al. (Ed). **Reproductive science and integrated conservation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2003. p. 375-393. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=DYU3Lk9BmIC&pg=PA392&lpg=PA392&dq=REID,+G.+McG.;+HALL,+H.+Reproduction+in+fishes+in+relation+to+conservation.&source=bl&ots=oFB7UAVKTh&sig=T32ugSWk6hPsqSLP_AziWs-AoYk&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwiB3ICvobbOAhVFIJAKHR14Dr8Q6AEIjAA#v=onepage&q=REID%2C%20G.%20McG.%3B%20HALL%2C%20H.%20Reproduction%20in%20fishes%20in%20relation%20to%20conservation.&f=false. Acesso em: 11 abr. 2016
127. RESENDE, E.K. et al. Melhoramento animal no Brasil: uma visão crítica espécies aquáticas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 8., 2010, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM, 2010.
128. 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.
129. RODRIGUES, J. P. et al. Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. **Cryobiology**, Rockville, v. 56, n. 2, p. 144-151, 2008.
130. RODRIGUEZ-WALLBERG, K. A.; OKTAY, K. Recent advances in oocyte and ovarian tissue cryopreservation and transplantation. Best practice & research. **Clinical Obstetrics & Gynaecology**, Amsterdam, v. 26, n. 3, p. 391-405, 2012.
131. ROJAS, C. et al. Vitrification of immature and in vitro matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments. **Cryobiology**, Rockville, v. 49, n. 3, p. 211-220, 2004.
132. ROSATO, M. P.; IAFFALDANO, N. Cryopreservation of rabbit semen: comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. **Theriogenology**, Los Altos, v. 79, n. 3, p. 508-516, 2013.

133. SALEHNIA, M. et al. Apoptosis of human ovarian tissue is not increased by either vitrification or rapid cooling. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 25, n. 5, p. 492-499, 2012.
134. SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 101, n. 1, p. 7-12, 1993
135. SELMAN, K.; WALLACE, R. A. Cellular aspects of oocyte growth in Teleosts. **Zoological Science**, Tokyo, v.6, p.211-231, 1989.
136. SELMAN, K. et al. Stages of oocyte development in the zebrafish *Brachio rerio*. **Journal of Morphology**, Philadelphia, v.218, p.203–224, 1993.
137. 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**, Amsterdam, v. 167, n. 1, p. 69-75, 2013.
138. 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**, Rockville, v. 60, n. 3, p. 315-321, 2010.
139. SHAW, J. M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A.O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, Los Altos, v. 53, n. 1, p. 59-72, 2000.
140. 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.
141. 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.
142. STREIT JR., D. P. et al. Qualitative parameters of the piapara semen (*Leporinus elongatus Valenciennes, 1950*). **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, v. 34, p. 337-344, 2008.
143. SUCCU, S. et al. Vitrification devices affect structural and molecular status of in vitro matured ovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 74, n. 10, p. 1337-1344, 2007.

144. TAJIMA, K.; SHIMIZU, N. Effect of sterol, alcohol and dimethyl sulfoxide on sorghum seedling damaged by above-freezing low temperature. **Proceedings of the Crop Science Society of Japan**, Tokyo, v. 42, n. 2, p. 220-226, 1973.
145. TALEVI, R.; BARBATO, V.; FIORENTINO, I. Successful slush nitrogen vitrification of human ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, New York, v. 105, n. 6, p. 1523-1531, 2016.
146. 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.
147. TEDDER, R. S. et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. **Lancet**, London, v. 15, n.3, p.46(8968), p. 137-140, 1995.
148. THIRUMALA, S. et al. Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. **Theriogenology**, Stoneham, v. 66, p. 964-973, 2006.
149. TOBIA, C. et al. Zebrafish embryo as a tool to study tumor/endothelial cell cross-talk. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease**, Amsterdam, v. 1832, n.9, p. 1371-1377, 2013.
150. TRAN, S; GERLAI, R. Recent advances with a novel model organism: Alcohol tolerance and sensitization in zebrafish (*Danio rerio*). **Profress in Beuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, Oxford, v. 55, p. 87-93, 2014.
151. TSAI, S.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Studies on chilling sensitivity of early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. **Cryobiology**, Rockville, v. 58, n. 3, p. 279-286. 2009.
152. 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.
153. TSVETKOV, T.; NAYDENOVA, T. Activity of ATP synthetase complex after low temperature tratment or freeze-drying of mitochondria isolated from skeletal muscles. **Criobiology**, Rockville, v. 24, p. 280-284, 1987.
154. VAJTA, G.; NAGY, Z. P. Are programable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive Biomedicine Online**, Cambridge, v. 12, p. 779-796, 2006.

155. VAJTA, G. et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 51, p. 53–58. 1998.
156. VAJTA, G. et al. Vitrification in assisted reproduction: myths, mistakes, disbeliefs and confusion. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 19, e. 3, p. 1-7, 2009.
157. VAJTA, G.; RIENZI, L.; UBALDI, F. M. Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 30, p. 325-333, 2015.
158. VAJTA, G. Vitrification in ART? Getting colder? **Acta Scientiae Veterinarie**, Porto Alegre, v. 38, n. 2, p. 565-572, 2010.
159. VAN BLERKOM, J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. **Mitochondrion**, Amsterdam, v. 26, n. 6, p. 347-354, 2011.
160. VANDERZWALMEN, P. et al. Aseptic vitrification of blastocysts from infertile patients, egg donors and after IVM. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 19, n. 5, p. 700-707, 2009.
161. 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**, Boston, v. 21, p. 58-67, 2011.
162. VIVEIROS, A. T. M.; GODINHOM H. P. Sperm quality and Cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 35, p. 137-150, 2009.
163. WALLACE, R; SELMAN, K. Cellular and Dynamic Aspects of Oocyte Growth in Teleosts. **American Society of Zoologists**, Utica, v. 21, p. 325-343, 1981.
164. WALLACE, R.A. Vitellogenesis and oocyte growth in non mammalian vertebrates. In: BROWDER, L.W. (Ed). **Developmental Biology, Oogenesis**. New York: Plenum Press, 1985. v. 1, p. 127-177
165. 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.
166. WOWK, B. Thermodynamic aspects of vitrification. **Cryobiology**, Rockville, v. 60, n. 1, p. 11-22, 2010.

167. WU, W. Zebrafish: A new vertebrate model for visualizing myelination in vivo. **Experimental Neurology**, New York, v. 261, p. 278-280, 2014.
168. YAMAMOTO, K.; ONOZATO, H. Steroid-producing cells in the ovary of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. **Annotationes Zoologicae Japonenses**, Tokio, v. 41, p. 119-128, 1968.
169. WEN, Y. et al. The protective role of antifreeze protein 3 on the structure and function of mature mouse oocyte in vitrification. **Cryobiology**, Rockville, v. 69, p. 394-401, 2014.
170. YAVIN, S. et al. Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. **Human Reproduction**, Oxford, v. 1, n. 4, p. 1–8, 2009.
171. ZARZYCKI, J. et al. (Ed.). **Glasses and the Vitreous State**. Cambridge : Cambridge University Press, 1991. 533p. (Cambridge Solid State Science Series)
172. ZERON, Y. et al. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. **Cryobiology**, Rockville, v. 45, n. 2, P. 143-152, 2002.
173. ZHANG, T. et al. Studies on membrane permeability of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes in the presence of different cryoprotectants. **Cryobiology**, Rockville, v. 50, n. 3, p. 285-293, 2005.
174. ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Feasibility studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology**, Rockville, v. 33, n. 1, p. 1–13, 1996.
175. ZHABG, J-M. et al. Oxidative stress and activities of caspase-8, -9, and -3 are involved in cryopreservation-induced apoptosis in granulosa cells. **European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 166, p. 52-55, 2013.
176. ZHOU, X. H. et al. Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of novel direct cover vitrification and conventional vitrification. **Cryobiology**, Rockville, v. 60, n. 2, p. 101-105, 2010.

VITA

Itamar Cossina Gomes, filho de Eguimar Cossina Gomes e Jorge Elias Gomes, Brasileiro, Nascido em São Paulo-SP, em 08 de junho de 1990. Concluiu o ensino fundamental na EMEF-Escola Municipal de Ensino Fundamental Dr.º Miguel Vieira Ferreira em 2003, e ensino médio no Colégio Estadual Dr.º Gastão Vidigal em 2007. Prestou Serviço Militar Obrigatório (com Honra ao Mérito) no Quartel da 5ª Região Militar: TG 05-009 em Maringá-PR, Concluiu o Curso Superior em Ciências Biológicas Bacharelado e Licenciatura pela Faculdade – CESUMAR – Centro Universitário de Maringá em 2013. Realizou estágio voluntário em micro-propagação e cultivo de bromélias e orquídeas, e realizou atividades de monitoria no MUDI – Museu Dinâmico Interdisciplinar, Participou de projetos de reposição da Flora na Serra do Cadeado (Mauá da Serra – PR) pela UEM – Universidade Estadual de Maringá. Cumpriu estágio obrigatório na UEM-CODAPAR, desempenhando atividades de manejo e aprendizado de técnicas de seleção e melhoramento de peixes tropicais. E foi aprovado no processo seletivo de mestrado 2/2013 na UFRGS, onde ingressou no curso de mestrado como bolsista CAPES.