

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

KAREL GELINA TORRES LOZANO

**VITRIFICAÇÃO DE ESPERMATOGÔNIAS DE LAMBARI (*Hyphessobrycon
boulengeri*) EM CÁPSULAS BIODEGRADÁVEIS**

Porto Alegre

2024

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

**VITRIFICAÇÃO DE ESPERMATOGÔNIAS DE LAMBARI (*Hyphessobrycon
boulengeri*) EM CÁPSULAS BIODEGRADÁVEIS**

KAREL GELINA TORRES LOZANO

Médico Veterinário/Universidad Nacional de San Martín-UNSM/Perú

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre em Zootecnia
Área de concentração: Produção animal

Porto Alegre (RS), Brasil

Fevereiro de 2024

CIP - Catalogação na Publicação

Torres Lozano, Karel Gelina
VITRIFICAÇÃO DE ESPERMATOGÔNIAS DE LAMBARI
(Hyphessobrycon boulengeri) EM CÁPSULAS BIODEGRADÁVEIS
/ Karel Gelina Torres Lozano. -- 2024.
85 f.
Orientador: Danilo Pedro Streit Jr..

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. criopreservação. 2. espermatogônias. 3.
gelatina. 4. hipromelose. I. Streit Jr., Danilo Pedro,
orient. II. Título.

Karel Gelina Torres Lozano
Médica Veterinária

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

Aprovada em: 23.02.2024
Pela Banca Examinadora


Homologado em: 22/03/2024
Por

Documento assinado digitalmente
 **DANILO PEDRO STREIT JR**
Data: 25/02/2024 06:26:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


DANILO PEDRO STREIT JR.
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientador

 **Sergio Luiz Vieira** Assinado de forma digital por
Sergio Luiz Vieira
Dados: 2024.03.26 09:12:58 -0300


SERGIO LUIZ VIEIRA
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia

Documento assinado digitalmente
 **ALEXANDRE FLORIANI RAMOS**
Data: 26/02/2024 10:06:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Alexandre Floriani Ramos
EMBRAPA

Documento assinado digitalmente
 **ALEXANDRE NINHAUS SILVEIRA**
Data: 05/03/2024 11:22:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Alexandre Ninhaus Silveira
UNESP

 **Leandro Miranda**

Leandro Andres Miranda
INTECH-Argentina

Documento assinado digitalmente
 **CARLOS ALBERTO BISSANI**
Data: 27/03/2024 15:29:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de Agronomia

Dedicatória

A meus pais Flor e Willer que sempre me apoiam em todas as minhas decisões e por não cortar as minhas asas em sair de casa, de meu país para cumprir meus sonhos e brindar-me o sustento que sempre preciso.

A minha irmã Karol pelos conselhos e cumplicidade ao longo deste tempo

Agradecimento

A meus pais pelo apoio econômico e emocional desde o primeiro dia que cheguei no Brasil.

Thaiza Freitas pela ajuda incondicional na execução dos experimentos e pela parceria em compartilhar seus conhecimentos além de me ensinar que não ter o resultado esperado é um resultado.

A professora Francielli Weber pelo apoio na realização do teste de estresse oxidativo.

A professora Leticia da área genética no campus do Vale pela colaboração no uso do espectrofotômetro para o teste de atividade mitocondrial.

Ao professor Rômulo Batista pela ajuda na execução da estatística dos dados.

Para a empresa Baesa através do projeto Piracanjuba pela aquisição da bolsa de estudo.

Ao professor Danilo Streit pela confiança em formar parte de seu grupo e pelo apoio no desenvolvimento das atividades.

A Raquel Santos e o grupo GERPA pelo apoio no desenvolvimento da histologia e a leitura e interpretação das lâminas.

A meus colegas do laboratório Tales Fabris e Douglas Selle pela ajuda na coleta dos lambaris as vezes que foi necessário, também para Eduardo, Larisse, Renata pela parceria nos dias de coleta de tecido testicular e aquecimento das amostras, e especialmente a Laís pelo apoio constante e desinteressado quando mais precisava de alguém.

A todas as pessoas que indiretamente apoiaram na realização dos experimentos e pelas recomendações para a melhora e também pelo impulso que sempre me brindaram.

E finalmente, a meus amigos do Perú; Sandra, Talita e Milagros a pesar da distância e o do fuso horário sempre ficaram prestos em me escutar e alentar quando sentia que não podia continuar.

Agradecimento Especial

Este estudo foi desenvolvido a partir do projeto DESENVOLVIMENTO DE BIOTECNOLOGIA PARA RECUPERAÇÃO POPULACIONAL DE ESPÉCIE NATIVA DE PEIXE EM RESERVATÓRIO DE UHE – CASE PIRACANJUBA (*Brycon orbignyanus*) com apoio da Programa de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação regulado pela ANEEL

Vitrificação de espermatogônias de lambari (*Hyphessobrycon boulengeri*) em cápsulas biodegradáveis

Autor: Karel Gelina Torres Lozano

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

Resumo – O lambari (*Hyphessobrycon boulengeri*) é uma espécie nativa do estado do Rio Grande do Sul, de pequeno tamanho e fácil manejo tornando-se em um peixe para ser utilizado na pesca esportiva, consumo e pesquisas contribuindo a ser uma espécie de interesse comercial. A presente pesquisa origina-se pela necessidade de preservar mediante a técnica da vitrificação o tecido testicular, comparando a eficiência de recipientes biodegradáveis e (cápsula de gelatina, cápsula de hipromelose) dos convencionais (criotubo). No experimento 1 constava em avaliar e selecionar o melhor protocolo de vitrificação para tecido testicular testado em diferentes quantidades de Solução de equilíbrio (ES) e solução de vitrificação (VS), sendo avaliado a integridade de membrana das espermatogônias pela coloração com azul de tripan. O protocolo três (P3) (2 M DMSO + 2.5 M etileno glicol) mostrou maior viabilidade celular ($25.42 \pm 4.19\%$) e com este se desenvolveu o segundo experimento. No experimento 2 foram analisadas a concentração e viabilidade celular, atividade mitocondrial por ensaio MTT e estresse oxidativo por TBARS e FRAP. Os resultados indicaram que os criotubos e as cápsulas de gelatina mantem similar concentração celular a diferença das cápsulas de hipromelose. A atividade mitocondrial não foi afetada entre os tratamentos após o aquecimento. Além, criotubos e cápsulas de hipromelose mostraram maior capacidade anti-oxidativa em comparação com as cápsulas de gelatina. Os resultados obtidos indicam que os recipientes biodegradáveis têm a capacidade de criopreservar espermatogônias após a vitrificação e aquecimento, além podem ter um rol importante como recipientes de vitrificação convertendo-se em uma alternativa econômica e amigável com o ambiente.¹

Palavras-chave: criopreservação; espermatogônias; gelatina; hipromelose.

¹ Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (85 p.) fevereiro, 2024.

Vitrification of spermatogonia from lambari (*Hyphessobrycon boulengeri*) in biodegradable capsules

Author: Karel Gelina Torres Lozano

Advisor: Danilo Pedro Streit Jr.

Abstract: The lambari (*Hyphessobrycon boulengeri*) is a fish native species to the state of Rio Grande do Sul, small in size and easy to handle, making it a fish to be used in sports fishing, consumption and research, contributing to being a species of commercial interest. The present research originates from the need to preserve testicular tissue using the vitrification technique, comparing the efficiency of biodegradable containers (gelatin capsule, hypromellose capsule) with conventional ones (cryotube). Experiment 1 consisted of evaluating and selecting the best vitrification protocol for testicular tissue tested in different amounts of Equilibrium Solution (ES) and Vitrification Solution (VS), and membrane integrity of spermatogonia cells was evaluated by trypan blue staining. Protocol three (P3) (2 M Me₂SO + 2.5 M ethylene glycol) showed greater cell viability (25.42± 4.19%) and with this the second experiment was developed. In experiment 2 cell concentration and viability, mitochondrial activity by MTT assay and oxidative stress by TBARS and FRAP were analyzed. The results indicated that cryotubes and gelatin capsules maintain similar cell concentrations compared to hypromellose capsules. Mitochondrial activity was not affected between treatments after warming. Furthermore, cryotubes and hypromellose capsules showed greater antioxidative capacity compared to gelatin capsules. The results obtained indicate that biodegradable containers have the ability to cryopreserve spermatogonia after vitrification and heating, and can also play an important role as vitrification containers becoming an economical and friendly alternative to the environment.²

Keywords: cryopreservation; spermatogonia; gelatin; hypromellose.

² Master of Science dissertation in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (85 p.) fevereiro, 2024.

Sumário

CAPÍTULO I.....	15
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. Estudo da criopreservação.....	16
2.2. Criopreservação de células reprodutivas em peixes	17
2.3. Crioprotetores	19
2.3.1. Tipos de crioprotetores	19
2.4. Métodos de criopreservação	20
2.4.1. Congelamento lento	21
2.4.2. Vitrificação.....	21
2.5. Efeitos da criopreservação.....	21
2.6. Recipientes para criopreservação	22
2.7. Cápsulas farmacêuticas	24
2.7.1. Cápsulas gelatinosas	25
2.7.2. Cápsulas não-gelatinosas	25
2.8. Preservação de tecido testicular em peixes	26
2.9. Espermatogônias	27
2.10. Métodos de avaliação da viabilidade das espermatogônias	30
2.11. LAMBARI (<i>Hyphessobrycon boulengeri</i>)	32
2.11.1. Classificação taxonômica	33
2.11.2. Características de <i>Hyphessobrycon boulengeri</i>	33
3. HIPÓTESE E OBJETIVOS	35
3.1. Hipótese.....	35
3.2. Objetivos	35
3.2.1. Objetivo geral	35

3.2.2. Objetivos específicos.....	35
CAPÍTULO II ¹	36
USE OF ECO-FRIENDLY RECIPIENTS FOR VITRIFICATION OF SPERMATOGONIAL CELLS.....	37
1. Introduction.....	37
2. Material and methods	38
2.1. Collection and euthanasia	38
2.2. Experimental design.....	39
2.3. Vitrification of testicular pieces and warming procedure	41
2.4 Tissue digestion procedure.....	42
2.5 Viability Assessment.....	42
2.6 Mitochondrial activity	42
2.7 Oxidative stress.....	43
3. Statistical analysis	43
4. Results	44
4.1. Experiment 1	44
4.2. Experiment 2	45
5. Discussion	48
References	51
CAPITULO III.....	54
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
APÊNDICE	68
VITA.....	82

Relação de figuras

CAPÍTULO I

Figura 1. Espermatogônias de Lambari (*Hyphessobrycon boulengeri*) observado em microscópio ótico em aumento 10x 30

Figura 2. Exemplar do Lambari (*Hyphessobrycon boulengeri*) 33

CAPÍTULO II

Figure 1. Experiment 1. Protocols of vitrification tested. 39

Figure 2. Experiment 2. a) tissue collection, fragmentation, vitrification and storage of the samples in cryotube, gelatin and hypromelose capsule, b) warming procedure with the warming solutions (WS1, WS2, WS3) and their analyze. 41

Figure 3. Spermatogonial cell concentration (cell/g). Spermatogonial cell concentration (cell/g) of *Hyphessobrycon boulengeri*. Spermatogonial cell concentration observed at protocols tested. P1(1.5 M methanol + 4.5 M propylene glycol), P2(1.5 M methanol + 5,5 M Me₂SO), P3(2 M Me₂SO + 2.5 M ethylene glycol) and P4(3M propylene glycol + 3 M Me₂SO. Different letters indicate differences between the groups by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn test. ... 44

Figure 4. Cellular viability (%) observed in the testicular tissue vitrified of *Hyphessobrycon boulengeri* with the protocols tested. Different letter indicated significantly differences by Tukey test. 45

Figure 5. Spermatogonial cell concentration (Cell/g) recovered in cryovials, gelatin capsules and Hypromellose capsules. Different letters indicate differences between groups using the ANOVA test followed by the Tukey test..... 46

Figure 6. Cellular viability (%) observed in the testicular tissue vitrified of *Hyphessobrycon boulengeri* sustained in cryovials, gelatin capsules and

hypromellose capsules. Different letters indicate significative difference using the Tukey test.46

Figure 7. Mitochondrial activity observed in the testicular tissue vitrified of *Hyphessobrycon boulengeri* sustained in cryovials, gelatin capsules and hipromellose capsules. Different letters indicate significative difference using the Tukey test.47

Figure 8. Lipidic peroxidation by the analysis of the Thiobarbituric Acid Reactive Substance – TBARS (mol of MDA/g) observed in the testicular tissue vitrified of *Hyphessobrycon boulengeri* sustained in cryovials, gelatin capsules and hipromellose capsules. Different letters indicate significative difference using the Tukey test.47

Figure 9. Antioxidant capacity measured with the method FRAP (Ferrica Reducing Antioxidant Power) observed in the testicular tissue vitrified of *Hyphessobrycon boulengeri* sustained in cryovials, gelatin capsules and hipromellose capsules. Different letters indicate significative difference by the Tukey test.48

Relação de abreviaturas e símbolos

FDA	diacetato de fluoresceína
Me ₂ SO	dimetilsulfóxido
DNA:	ácido desoxirribonucleico
RNA	ácido ribonucleico
ATP	adenosina trifosfato
G	glicerol
EG	etilenoglicol
PG	propileno glicol
IP	iodeto de propídio
FBS	Soro fetal bovino
°C	graus célsius
Min	minuto (s)
>	maior que
<	menor que
NL ₂	nitrogênio líquido
pH	potencial hidrogeniônico
%	porcentagem
±	mais ou menos
cm	centímetro (s)
g	grama (s)
Mg	miligrama (s)
mL	mililitro (s)
mm	milímetro (s)
µL	microlitro (s)

M	molar
P	potencial de erro
ERO	espécies reativas de oxigênio
MET	microscopia eletrônica de transmissão
HPMC	hidroxipropilmetil celulosa
PGC	células germinativas primordiais
ES	Solução de equilíbrio
VS	Solução de vitrificação
WS	Solução de aquecimento

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Os peixes constituem mais de 50% do grupo de vertebrados conhecidos, sendo os mais variados os pertencentes à classe dos teleósteos, abrigando aproximadamente 96% das espécies deste grupo (Vazzoler, 1996; Bone, *et al.* 1995; Jobling, 1995). Atualmente no Brasil, cerca de 64 espécies aquáticas estão sendo cultivadas (FAO, 2022).

Dentre estas espécies, os peixes de água doce da família Characidae, subfamília tetragonopterinae alberga o maior número de espécies de peixes nativos reconhecidos correntemente como lambaris (Britski, 1972).

Há quase três décadas, Paiva (1997) já relatava que a produção desta espécie era destinada para o consumo, vendido na indústria em forma de conservas e também, como alimento natural para outros peixes carnívoros e como isca viva na pesca esportiva.

Os lambaris possuem relevantes características para serem utilizados como modelos experimentais, pela facilidade de adaptação e manejo, crescimento acelerado e a rápida madurez sexual atingida aos quatro meses de idade (Gonçalves *et al.*, 2014; Porto-Foresti *et al.*, 2010; Yasui *et al.*, 2014; Castilho-Almeida, 2007), podendo ser encontrados em trabalhos de pesquisa de alimentação e nutrição (Hayashi *et al.*, 2004; Meurer *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2016), manipulação cromossômica (Adamov *et al.*, 2017), híbridos estéreis (Piva *et al.*, 2018), até o transplante de células germinativas primordiais (PGCs) (Coelho *et al.*, 2019).

No estudo da criogenia, uma ferramenta utilizada na conservação de recursos genéticos em diversas espécies de peixes de interesse comercial, bem como para espécies ameaçadas de extinção, é a criopreservação de sêmen de peixes (Tiersch, 2008).

Esta técnica permite obter um manejo estruturado para reprodutores, conseguindo assim reduzir a quantidade e garantir a aquisição de sêmen durante ou após a época de reprodução da espécie a ser trabalhada (Cabrita *et al.*, 2010). No entanto, preserva apenas o genoma paterno não é suficiente para manter a diversidade genética, que também depende do genoma de origem materna (Zhang *et al.*, 2007).

Uma alternativa para manutenção dos recursos genéticos das espécies que vem despertando interesse, é a criopreservação de espermatogônias tronco, que são células que possuem a informação genética completa de um indivíduo (diplóide).

Estas células, podem ser transplantadas para outro peixe, podendo se diferenciar em espermatozoides ou oócitos, dependendo do ambiente somático em que se desenvolvem (Lee *et al.*, 2013; Okutsu *et al.*, 2006), e além disso, podem ser maturadas em espermatozoides *in vitro* (Higaki *et al.*, 2017).

A vitrificação de tecido testicular de peixes afim de preservar espermatogônias é uma técnica de criopreservação que tem demonstrado ótimos resultados com taxas de viabilidade entre 44,9 a 84% (Marinović *et al.*, 2019; Higaki *et al.*, 2017; Seki *et al.*, 2013).

A abordagem da criopreservação de tecido testicular, é vantajosa pois fornece espermatogônias para serem transplantadas, essencialmente não contaminadas por as espermatogônias mortas, após o congelamento/descongelamento, e que são digeridas durante a dissociação enzimática, tornando o processo de criopreservação mais simples do que criopreservar espermatogônias dissociadas (Pšenička *et al.*, 2016).

A eficiência da criopreservação de espermatogônias, bem como de outras células ou tecidos é altamente dependente de inúmeros fatores que devem ser aperfeiçoados em cada protocolo a ser utilizado para cada espécie (Elliot *et al.*, 2017; Magnotti *et al.*, 2016).

No entanto, para o desenvolvimento dos protocolos, inúmeras ferramentas são utilizadas no processo de criopreservação, na maioria produzidas de plásticos como o polipropileno. Este material é descartado em quantidades elevadas, gerando contaminação pela precária manipulação dos resíduos no momento do descarte e por consequência incrementando a poluição e deterioração do meio ambiente.

De acordo com Luckachan; Pillai (2011) este é o motivo pelo qual vem sendo testados diferentes recipientes alternativos com modificações na sua estrutura de composição química. Indiscutivelmente os maiores interesses são para materiais com propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e em abundância no meio ambiente (Pillai, 2010; Vroman; Tighzert, 2009), cumprindo a função de criopreservar material genético, na expectativa de obter resultados similares ou parecidos que feitos de maneira convencional.

Portanto, o presente projeto tem como objetivo avaliar a eficiência das capsulas de gelatina e hipromelose em comparação ao criotubo de polipropileno como recipientes para a criopreservação de tecido testicular de *H. Boulengeri* visando preservar espermatogônias tronco.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Estudo da criopreservação

A descrição inicial sobre a criopreservação de sêmen foi relatada por Spallanzani em 1776. O qual, realizou o resfriamento do sêmen humano, cavalo e sapo na neve, por até 30 minutos. Observando que os espermatozoides deixaram de ter atividade, mas puderam ser ativados novamente após o descongelamento. Essa queda na temperatura foi utilizada como ferramenta para reduzir a atividade metabólica e ser capaz de prolongar a atividade do espermatozoide.

Após um século, a sobrevivência do espermatozoide humano foi observada quando o sêmen foi congelado a -17°C (Mantegazza, 1866, p. 183 *apud* Großfeld *et al.*, 2008, p. 1225-1233). Uma das primeiras pesquisas que obtiveram sucesso na criopreservação de gametas foi relatada por Polge *et al.* (1949), com espermatozoides de galo. A partir disso, vários estudos foram desenvolvidos na criopreservação de diferentes células e tecidos.

A descoberta do dimetilsulfóxido (DMSO) (Lovelock; Bishop, 1959), bem como, a substituição nos anos 50 da neve carbônica que atingiu -79°C por nitrogênio líquido com o qual são alcançados -196°C (Paz, 2009), houve um aumento significativo de estudos. Devido ao seu pequeno tamanho, um dos tipos celulares mais desenvolvidos para pesquisa de criopreservação, são os espermatozoides.

Neste sentido têm sido utilizados na geração de bancos de germoplasma, proporcionando facilidade em sua aquisição ao contrário de outras células e embriões, além da possibilidade de sua utilização por meio de técnicas de reprodução assistida, como a inseminação artificial, fertilização *in vitro*, entre outros (Santiago-Moreno *et al.*, 2019).

Na aquicultura, a criopreservação de sêmen começou com Blaxter (1953) que fertilizou ovos de arenque (*Clupea harengus* Linnaeus, 1758) usando sêmen congelado. Desde então, o interesse na aplicação desta técnica aumentou, sendo prioritária a sua utilização em espécies de vocação comercial (Bustamante *et al.*,

2019). No entanto, é importante padronizar os protocolos a serem utilizados, levando em consideração as espécies a serem estudadas ou escolhidas para realizar o trabalho (Nahiduzzaman et al., 2012; Paz, 2009). Pensando em manter a variabilidade genética das espécies, tem se usado a criopreservação e o descongelamento de células testiculares para a produção viável tanto de oócitos quanto espermatozóides (Lee et al., 2016; Lee et al., 2016; Lee; Yoshizaki, 2016). Quanto a aplicação, a criopreservação de células espermatogoniais pode ser utilizada como auxílio ao repovoamento de populações de peixes (Hagedorn et al., 2018).

2.2. Criopreservação de células reprodutivas em peixes

Mudanças no habitat são mais percebidas pelos peixes do que pelos animais terrestres (Volpedo et al., 2016). Consequentemente, estima-se que os peixes de água doce tenham uma taxa de extinção entre 112 e 885 vezes maior do que as taxas de extinção natural (Tedesco et al., 2017). Com isso, diferentes estratégias são necessárias buscando formas de minimizar a perda da população de peixes em ambientes naturais (Sirol; Britto, 2005).

Os recursos genéticos em aquicultura constituem um patrimônio valioso, por isso é muito importante poder contribuir para a sua conservação (Galo, et al., 2011). Os chamados "zoológicos congelados" desenvolveram-se como principal fonte de abastecimento durante um longo período de tempo, em que células e tecidos criopreservados, principalmente gametas de ameaçadas ou de certas espécies raras, podem ser recolhidos e utilizados quando necessário (Clarke, 2009).

Da mesma forma, a criopreservação de células testiculares espermatogoniais tem o potencial de salvar espécies de peixes em todo o mundo devido à capacidade das espermatogônias de regenerar organismos, uma nova ferramenta para combater a extinção de espécies.

Na aquicultura, a preservação de sêmen de peixe abre um novo campo de possibilidades, pois é um instrumento muito útil na reprodução que permite acesso permanente a uma fonte de sêmen de qualidade para um bom controle da produção de ovos e alevinos de reprodução artificial para reprodução ou repovoamento de uma espécie (Diaz; Gonzales, 2018).

A criopreservação é um método eficaz para armazenamento a longo prazo de espermatozoides viáveis e também prevê a falta de gametas em um determinado período de tempo (Zhang *et al.*, 2003).

A disponibilidade contínua de sêmen oferecido pela técnica de criopreservação facilita o manejo da sincronia reprodutiva de espécies que, em muitos casos, têm fêmeas prestes a desovar e não havendo animais com disponíveis com sêmen, seja por imaturidade ou porque seu período de reprodução já terminou (Diaz; Gonzales, 2018).

Algumas das vantagens da criopreservação de sêmen são: redução do número de machos reprodutores que devem ser criados para produzir alevinos (Herman *et al.*, 1994), evitar o estresse sofrido pelo animal devido ao manejo, mudanças na temperatura da água, falta de oxigênio (Diaz; Gonzales, 2018), facilidade no transporte de sêmen para possíveis trocas entre fazendas de aquicultura e assim reduzir os problemas de assincronia reprodutiva (Lopera-Barrera, 2009).

O uso da criopreservação de sêmen em peixes vem sendo desenvolvido com sucesso em inúmeras espécies ao redor do mundo (Tiersch, 2008). No Brasil, estudos têm sido realizados sobre a criopreservação de sêmen de peixes como *Colossoma macropomum* (Mello *et al.*, 2016), *Prochilodus lineatus* y *Brycon orbignyanus* (Di Chiacchio *et al.*, 2017), *Brycon opalinus* (Orfão *et al.*, 2011), *Brycon orbignyanus* (Carmo *et al.*, 2014) e *Brycon henni* (Restrepo-Betancur *et al.*, 2017).

Por outro lado, a biotecnologia de criopreservação aumentou o desenvolvimento de novos e variados protocolos para preservação de embriões (Streit *et al.*, 2004; Ahammad *et al.*, 2003). Os protocolos, demonstraram que certas diferenças e peculiaridades podem ser encontradas em protocolos ótimos de criopreservação entre espécies, portanto, é necessário otimizar o procedimento de criopreservação para cada espécie de peixe. (Lee & Yoshizaki, 2016; Marinović *et al.*, 2016).

O sucesso dos protocolos de criopreservação depende do uso de soluções adequadas para proteção das células contra quedas extremas de temperatura e do uso de taxas ideais de congelamento e descongelamento para cada tipo de célula (Dominguez *et al.*, 2020).

As células que são congeladas e armazenadas corretamente podem ser viáveis sem danificar seu DNA por muitos anos (Mazur, 1977). Além de isso,

pesquisas focadas em resfriamento de embriões de várias espécies descrevem bons resultados, como os obtidos com o resfriamento de seis horas de embriões de pacu (Streit *et al.* 2007).

Então, inúmeros diferentes autores sugeriram continuar com o estudo de novas técnicas de resfriamento em novas espécies que não possuem protocolo específico (Fornari *et al.*, 2012; Fornari, *et al.*, 2011; Streit *et al.*, 2007; Ahammad *et al.*, 2002).

2.3. Crioprotetores

O sucesso de um protocolo de criopreservação baseia-se na escolha correta dos crioprotetores a serem utilizados, pois a criopreservação induz dano celular por meio de diferentes mecanismos, como formação de cristais de gelo, estresse osmótico, estresse oxidativo, entre outros (Cabrita *et al.*, 2014).

Durante o processo de congelamento, substâncias crioprotetoras são essenciais para reduzir os danos espermáticos causados pela queda de temperatura, pois atuam na desidratação das células durante o congelamento (Mizukami *et al.*, 1999).

Os crioprotetores são produtos químicos (González *et al.*, 2011) que obrigatoriamente devem ter baixa toxicidade para a célula e alta solubilidade em água (Atencio *et al.*, 2013). A sua entrada na célula produz a saída de água intracelular e diminui a temperatura de nucleação do gelo, impedindo a formação de cristais no interior da célula (Sieme *et al.*, 2016; Paz, 2009).

A formação de gelo intracelular é letal para a célula, dependendo principalmente do tamanho e da quantidade formados no citoplasma, pois altas taxas de resfriamento produzem pequenos cristais intracelulares que podem se tornar inofensivos, mas estes podem se juntar e crescer durante o congelamento, formando a recristalização (Holt, 2000; Mazur, 1980).

2.3.1. Tipos de crioprotetores

O sucesso da criopreservação é resultado da adição de um crioprotetor para que as células suportarem às injúrias durante esse processo (Matsumoto *et al.*, 2004; Mycock *et al.*, 1995; Plattner *et al.*, 1972). Dependendo de sua capacidade de

penetrar na membrana plasmática, eles podem ser permeáveis ou impermeáveis (Xin *et al.*, 2017).

2.3.1.1. Crioprotetores permeáveis

Os crioprotetores permeáveis permitem reduzir a taxa de difusão da água da célula para evitar a formação de cristais de gelo, reduzindo as mudanças no volume da célula, concentração de sais, diminuindo a temperatura de nucleação homogênea e reduzindo a taxa de formação dos cristais de gelo (Gonzalez, 2011). Os crioprotetores permeáveis mais utilizados são o Glicerol (G), Dimetil Sulfoxido (DMSO), 1-2 Propanodiol, Etileno Glicol (EG), Propileno Glicol (PG), Polietileno Glicol (PEG), Etanol e outros Álcoois; sendo que todos esses compostos desidratam a célula para ajudar a proteger o citoplasma (Garcia; Montenegro, 2014).

2.3.1.2. Crioprotetores impermeáveis

Os crioprotetores não permeáveis têm um alto peso molecular, razão pela qual não podem penetrar na membrana celular (Trindade, 2019). Tem a função de proteger a membrana externa celular, afim de evitar seu rompimento (Streit Jr, 2013). Dentro deste grupo podemos encontrar os açúcares; galactose, lactose, sacarose, polímeros como hidroxietil amido e algumas proteínas, proteínas do leite (Elliot *et al.*, 2017). Esses compostos extraem água livre intracelular usando a diferença de pressão osmótica sem penetrar na célula; são eficazes na preservação da funcionalidade e estrutura das membranas em baixa atividade de água (Garcia; Montenegro, 2014).

2.4. Métodos de criopreservação

O desenvolvimento da criopreservação é efetuado por meio de dois métodos: congelamento lento e a vitrificação. Para realizá-los é importante ter em conta a exposição aos crioprotetores, o resfriamento com a redução de temperatura de maneira progressiva (congelamento lento) ou completa (vitrificação), o armazenamento durante tempos prolongados, o descongelamento ou aquecimento e a remoção dos crioprotetores (Castro *et al.*, 2011).

2.4.1. Congelamento lento

O congelamento lento é baseado em um dispositivo de congelamento de velocidade controlada, evitando assim problemas osmóticos e os efeitos da deformação celular (Carolsfeld *et al.*, 2003). Utiliza-se baixas concentrações de crioprotetores para evitar possíveis danos tóxicos e osmóticos durante o processo, embora seja insuficiente para evitar a formação de cristais de gelo nas células (Esparza; Parra, 2015). Por outro lado, é rápida o suficiente para evitar a superexposição das células aos efeitos tóxicos dos agentes crioprotetores e soluções salinas concentradas (Muldrew; Mcgann, 1996) em média, 2°C/minuto até alcançar uma temperatura entre - 4 e - 9°C. Esta faixa térmica o material é mantido por um período entre 10 a 15 minutos para que o mesmo alcance uma estabilidade térmica, nesse momento pode se realizar a indução manual da cristalização, ou “seeding” (Jondet *et al.*, 1984).

2.4.2. Vitrificação

O congelamento ultra-rápido foi originalmente descrito para congelamento de embriões por Trouson (1986). Consiste no congelamento ultrarrápido da amostra em baixos volumes de meio, passando da temperatura ambiente a -196°C em menos de um segundo (Fuller; Paynter, 2004; Kasai, 2004; Liebermann; Tucker, 2004; Liebermann *et al.*, 2002), aumento a viscosidade e formando um sólido amorfo (Boiso, 2001), ignorando o estado sólido cristalino (Liebermann; Tucker, 2004). É uma técnica que possui a taxa de resfriamento extremamente rápida (> 20.000°C/min ou superior) (Vajta, 2013). Não é necessário equipamento específico e a técnica é rápida e simples, entretanto, necessita de altas concentrações de crioprotetores tornando suscetível um aumento de toxicidade e danos osmóticos (Rodríguez *et al.*, 2012).

2.5. Efeitos da criopreservação

O grau de toxicidade do crioprotetor e sua taxa de difusão através da membrana plasmática dependem da temperatura em que são incorporados e do tempo de exposição da célula (Cruz *et al.*, 2006). Os protocolos de criopreservação,

por estarem em constante contato com a célula, causam diferentes danos nas células reprodutivas, devido ao estresse químico, físico e alterações na membrana plasmática lipídica a que estão expostas, podendo causar lesões estruturais e funcionais (Trindade, 2019). Nesse sentido, o congelamento intracelular é letal para a célula dependendo principalmente do tamanho e da quantidade de cristais de gelo formados no citoplasma, pois altas taxas de resfriamento produzem pequenos cristais intracelulares que podem se tornar inofensivos, mas podem se unir e crescer durante o descongelamento por meio de um processo chamado de recristalização (Holt, 2000; Mazur, 1980). Além disso, o processo de congelamento e descongelamento das células aumentam a formação de EROs como radicais hidroxila (OH⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e superóxido de amônio (O₂⁻), ativando assim a apoptose (Trindade, 2019). Estas substâncias também danificam proteínas, lipídios e DNA se as células não forem capazes de se desintoxicar (Len *et al.*, 2019; Temple *et al.*, 2005)

2.6. Recipientes para criopreservação

Uma das principais características para o sucesso na criopreservação é a escolha de um recipiente adequado que proporcione uma curva de resfriamento eficiente mantendo as células em equilíbrio e garantindo sua sobrevivência no momento do aquecimento.

Para escolher um recipiente é importante ter em consideração o tamanho, volume, forma e material com o qual foi desenhado (Yang; Huo 2022). Porém, existem diversos métodos de vitrificação, alguns podem ser desenvolvidos em sistema aberto ou fechado, ou seja, aqueles que não permitem o contato direto do material com NL₂.

Dentre os recipientes usados em sistema aberto estão, as grades de microscopia eletrônica, constituída de cobre (Martino *et al.*, 1996); Palhetas abertas (*Open Pulled Straw*) produzidas de plástico polipropileno (Vajta *et al.*, 1998); Cryotop, uma palheta de polipropileno conjugada a uma haste plástica com uma tampa plástica (Hamawaki, *et al.*, 1999); Cryoloop, constituído por uma alça de metal presa com um laço de nylon, normalmente confeccionado na tampa de um criotubo (Lane, *et al.*, 2001); Sistema de vitrificação Kitasato (KVS), consiste em uma pinça de resina de acrilonitrila butadieno estireno e um suporte (Momozawa *et al.*, 2017) e

variações destes recipientes. Em sistemas abertos a taxa de resfriamento é alta ($>20.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$) (Vanderzwalmen *et al.*, 2009), característica desejada para a vitrificação. Porém, o contato direto do material com NL_2 gera risco de contaminação cruzada entre amostras e exposição a contaminantes presentes no tanque N_2 líquido (Bielanski *et al.*, 2003 e 2009).

Assim, vários recipientes foram desenvolvidos para sistemas fechados de vitrificação. No entanto, uma preocupação com relação a esses recipientes é se uma taxa de resfriamento suficiente pode ser alcançada em comparação com os recipientes abertos (Momozawa *et al.*, 2019).

O recipiente de sistema fechado mais utilizado é o criotubo/frasco criogênico, normalmente feito de polipropileno com tampa de rosca, podendo ser ou não esterilizado, utilizado para tecidos, células, oócitos e embriões. Outros recipientes foram criados a partir de adaptações dos sistemas abertos e afim de aumentar a curva de congelamento, como o Cryotip, um canudo de plástico provido de uma luva metálica de proteção deslizante (Kuwayana, *et al.*, 2005), os capilares de paredes finas, estreitas e fechadas, Micropette (Parmegiani, *et al.*, 2012), palhetas como sistema fechado (Isachenko, *et al.*, 2006), Sistema de vitrificação Kitasato (KVS) fechado, construído com uma capa de polipropileno (Momozawa *et al.*, 2019), e Cápsula de aço inoxidável (Aquino *et al.*, 2014). E para garantir a segurança de que o material não será contaminado foi desenvolvido os recipientes Vitrisafe (Vanderswalmen, *et al.*, 2009), e o “kit de alta segurança para vitrificação” (High Security Vitrification System - HSV) (Abdelhafez, *et al.*, 2011). Porém, todos esses recipientes são de materiais de baixa degradabilidade, produzindo danos ao meio ambiente após seu uso ao passo que poucos são os estudos com recipientes de materiais biodegradáveis.

Visando a utilização de materiais alternativos e que podam ser biodegradáveis, Kim *et al.* (2012) desenvolveu containers de papel para vitrificação de blastocisto bovino e obteve taxa de sobrevivência de 95,8%. Porém, estes containers de papel são armazenados em criotubo de polipropileno.

Em um trabalho mais antigo, Thanawala *et al.* (1987) analisou viabilidade do uso de cápsulas de gelatina dura tratada com cera, parafina e polímero, para criopreservação de sêmen de touro. Neste estudo, a cápsula tratada com polímero se manteve mais íntegra que as outras, e obteve resultados semelhantes para motilidade, porcentagem de espermatozoides vivos e anomalias morfológicas

quando comparado com a palheta de 0,5ml. Entretanto, houveram menor porcentagem de acrossomas intactos. Porém este autor não descreve como é produzido o tratamento com polímero e não foram mais produzidos estudos nesse segmento. Loken *et al.* (2005) propôs um novo método para armazenamento de amostras de bancos de tecidos para criohistologia, com cápsulas farmacêuticas tamanho “00” de gelatina e celulose. Amostras de tecidos humanos (músculo, rim, seio e fígado) foram congeladas nas cápsulas, armazenadas no NL₂ em criotubos. Ao analisar artefatos e rachaduras nos tecidos, as cápsulas de celulose se mostraram mais resistente que a de gelatina, onde para amostras de fígado e seio não apresentaram danos em cápsulas de celulose. É importante ressaltar que neste estudo não foi possível analisar a viabilidade das células.

Outro estudo mais recente, que trabalho com criopreservação de sêmen de Jundiá (*Rhamdia quelen*), França *et al.* (2023) observou que a qualidade do sêmen criopreservado em cápsulas de gelatina e hipromelose sendo superior ao criopreservado em palhetas. Neste estudo os autores ressaltaram as qualidades amigáveis ao meio ambiente das cápsulas farmacêuticas (gelatina ou hipromelose), em função da biodegradabilidade, além de ser um recipiente para a criopreservação de gametas de baixo custo.

Cada vez mais a criopreservação de tecidos e células é requerida, para reprodução humana, produção animal e criação de bancos de germoplasma, como uma procura para a conservação das espécies, sendo assim, necessário o desenvolvimento de mais pesquisas e de recipientes para criopreservação e armazenamento feitos de materiais biodegradáveis, gerando menos resíduos e danos ao meio ambiente.

2.7. Cápsulas farmacêuticas

As cápsulas são recipientes pequenos que são utilizados como formas de unidades de doses sólidas de medicamentos administradas via oral, os quais são feitas de materiais solúveis (Aliyu *et al.*, 2020), comumente são produzidas usando gelatina de composição dura ou macia, polissacáridos de plantas ou derivados (Fauzi *et al.*, 2023; Aliyu *et al.*, 2020). Porém, são desenvolvidas cápsulas com materiais alternativos produzidos de derivados de plantas, como os de alginato (Vishvesh *et al.*, 2015), carrageenan (Pudjiastuti *et al.*, 2017) ou hipromelose

(Kapoor, 2016). Existem diversos tipos de cápsulas para o desenvolvimento de medicamentos; como por exemplo, as cápsulas de gelatina dura ou macia, capsulas de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), cápsulas de polyvinyl álcool (PVA), mas geralmente estão divididas em a denominação de cápsulas gelatinosas e não-gelatinosas (Aliyu *et al.*, 2020).

2.7.1. Cápsulas gelatinosas

2.7.1.1. Cápsulas de gelatina dura (hard gelatine capsule)

Estão compostos por duas partes: o corpo e a capa superior de menor tamanho o qual tem a função para de cerramento da cápsula completamente (Aliyu *et al.*, 2020) são produzidas com colágeno proveniente da pele ou ossos de animais (Srividya *et al.*, 2014). As desvantagens deste grupo de cápsulas pela composição são variadas desde que são higroscópicos (Fauzi *et al.*, 2023) e pela ocorrência de doenças associadas a proteínas de origem animal (Woltjes *et al.*, 2000)

2.7.1.2. Cápsulas de gelatina macia (soft gelatine capsules)

As cápsulas estão compostas por uma parte inteira, e podem ser desenvolvidas em diferentes tamanhos e formas e de maior flexibilidade, além de ter na sua composição materiais susceptíveis a deterioração em presença de ar (Srividya *et al.*, 2014). Essas cápsulas tem diferentes aplicações na farmacêutica, produtos de nutrição, cosméticos e também de recreação nas balas de pintura (Ghosh; Jasti, 2005).

2.7.2. Cápsulas não-gelatinosas

2.7.2.1. Cápsulas de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC)

A hidroxipropilmetilcelulosa mais conhecida como hipromelose é produzida pela modificação sintética da celulosa que é um recurso vegetal renovável e seguro para ser consumido pelos humanos (Burdock, 2007). As cápsulas de hipromelose tem propriedades como temperatura de gelificação, flexibilidade, viscosidade e

hidratação e por isso que é o material elegível para a fabricação de cápsulas (Podczeck; Jones, 2004; Williams *et al.*, 2001).

2.7.2.2. Cápsulas de álcool polivinílico (PVA)

As cápsulas feitas de álcool polivinílico foram criadas como um substituto as cápsulas de gelatina, pela vantagem de ser higroscópicos, tendo uma cobertura macia com uma menor sensibilidade a humidade (Hoshi, 2004 *apud* Aliyu *et al.*, 2020). Este tipo de cápsulas é produzido de maneira industrial, tendo um valor econômico menor e não tem efeitos antimicrobianos (Ariga *et al.*, 1994). Além, possui propriedades de emulsificação, formação de espuma e de gelificante os quais são aplicadas na área farmacêutica (Gonzales; Alvarez, 2014.; Culjat *et al.*, 2013.; Hassan; Peppas, 2000.; Trieu; Qutubuddin, 1995).

2.8. Preservação de tecido testicular em peixes

Inúmeros métodos são utilizados para a preservação de material genético dos peixes, sendo dos mais conhecidos e utilizados através do sêmen. Entretanto, a disponibilidade do sêmen é limitada a fatores como: idade reprodutiva, temperatura, estação do ano, quantidade de animais e estes fatores podem limitar a disponibilidade para o uso.

Porém, uma ferramenta nova vem sendo estudada é a preservação de tecido testicular para a criopreservação de espermatogônias que podem maturar em espermatozoides ou oócitos após o transplante (Yoshizaki *et al.*, 2011).

A partir do interesse pela preservação de material genético, Pšenička *et al.*, (2016) comparou o procedimento de criopreservação de diferentes etapas de células testiculares e ovarianas em *Acipenser baerii* e 90% das células continuaram vivas após o congelamento/descongelamento e dissociação. Além disso, lograram transplantar as células em larvas obtendo proliferação de células após 90 dias da fertilização.

Marinović *et al.* (2019) criopreservaram fragmentos de tecido testicular de zebrafish (*Danio rerio*), através do congelamento lento e vitrificação (utilizando agulhas de acupuntura) obtendo uma efetividade similar e produzindo células germinais viáveis. Em seguida estes autores após descongelar e aquecer

transplantaram intraperitoneal e obtiveram colonização das gônadas onde foram implantadas.

Em seguida Rivers *et al.* (2020) descreveram o sucesso da criopreservação e isolamento de espermatogônias em rainbowfish australiano (*Melanotaenia fluviatilis*) desenvolvendo um protocolo para essa espécie com o objetivo de restaurar a população das espermatogônias. Neste estudo a viabilidade celular do protocolo de criopreservação foi a mesma do que as amostras utilizadas como controle, sendo considerado um grande avance para o desenvolvimento de um biobanco de células reprodutivas da ictiofauna australiana.

No estudo de Morita *et al.* (2021) os autores desenvolveram um método de criopreservação de espermatogônias de *Seriola quinqueradiata* transplantando na cavidade peritoneal em larvas alogênicas diferenciando-se em espermatozoides funcionais. Em estudos mais recentes, Boonanuntanasarn *et al.* (2023) desenvolveram um protocolo de criopreservação do todo o tecido testicular de um peixe ornamental asiática (*Pangasianodon hypophthalmus*) testando diferentes concentrações de crioprotetores permeáveis e não permeáveis, métodos de descongelamento, além de avaliar a expressão genica das células após o congelamento e que foram transplantadas em larvas alogênicas.

Já Cabrita *et al.* (2023) relataram uma metodologia de criopreservação e armazenamento de fragmentos de tecido testicular contendo células germinativas de *Solea senegalensis*, após o descongelamento analisaram *in vitro* as células e a colonização das gônadas dos peixes logo de ser transplantadas. Com este levantamento, é possível observar o desenvolvimento de diferentes protocolos e formas de criopreservação pela presença de células germinativas e preservar o material genético dos indivíduos.

2.9. Espermatogônias

O processo de espermatogênese é um processo de desenvolvimento complexo e ordenado no qual uma única célula-tronco espermatogonial diplóide (SSC) prolifera e se diferencia em uma forma madura, o espermatozoide (Lacerda *et al.* 2014; Oatley; Brinster, 2012). As espermatogônias estão preferencialmente localizadas nos túbulos seminíferos, que estão em contato com mais de 100

compartimentos intersticiais e na maioria dos casos estão próximos às células de Leydig e vasos sanguíneos (Paiva, 2017).

As espermatogônias estão em um microambiente que envolve as células-tronco, que é chamado de nicho (Ning *et al.*, 2011). Esse nicho é definido como o microambiente no qual as células-tronco podem fornecer suporte e produzir sinais regulatórios para se renovarem e assim alcançarem a diferenciação (Schofield, 1978). As células de nicho podem fazer contato direto com a célula-tronco e as células de nicho também podem secretar fatores parácrinos que atuam sobre as células-tronco ou ser células intermediárias que podem atuar como uma ponte de comunicação entre o nicho e as células-tronco (Ning *et al.*, 2011).

As células espermatogoniais apresentam plasticidade sexual, ou seja, têm a capacidade de se desenvolver em espermatozoides ou oócitos quando amadurecem (Molyneaux; Wylie 2004). Pesquisas recentemente desenvolvidas em aquicultura estão focadas na extração e posterior criopreservação de células espermatogoniais tronco de peixes devido à sua capacidade de preservar linhagens genéticas de grande valor, podendo também serem usadas em caso de emergências (Shang *et al.* 2018; Lacerda *et al.* 2013). As espermatogônias são células-tronco adultas notáveis que podem transmitir informações genéticas de geração em geração (Russel *et al.*, 1990) e também são ferramentas valiosas para a conservação de espécies através do transplante de células-tronco espermatogoniais (Lacerda *et al.*, 2010; Brinster; Zimmermann 1994). As espermatogônias podem ser transplantadas para organismos hospedeiros de uma espécie diferente, que podem então produzir gametas da espécie doadora. (Dunham 2011; Higuchi *et al.*, 2011). Este processo é altamente benéfico se a espécie hospedeira tiver uma taxa de crescimento acelerada, próxima à idade da maturidade sexual, e em casos mais convenientes, a prole é necessária. (Shang *et al.*, 2018).

A criopreservação de espermatogônias de peixes pode ocorrer de duas maneiras: isoladas por métodos enzimáticos e então criopreservadas; e criopreservação da gônada (testículos inteiros) ou fragmentos de tecido testicular (Pšenička *et al.*, 2016). Onde a criopreservação de tecido testicular se mostra vantajoso quando a coleta e criopreservação acontece em campo, pois a dissociação enzimática é um processo que leva horas para ser realizado e necessita de equipamentos (centrífuga e mesa agitadora). Além disso, a criopreservação de tecido inteiro é uma abordagem vantajosa porque fornecerá espermatogônias vivas,

essencialmente não contaminadas por espermatogônias mortas após o congelamento/descongelamento (Pšenička *et al.*, 2016). Lee *et al.* (2013) criopreservou por congelamento lento (1,3 M Me₂SO + 0,1 M trealose + 10% gema de ovo) testículo inteiro de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) imaturo (8 a 10 meses) obtendo viabilidade por tripan blue de 35.1 ± 5.3%. Quando transplantado, os receptores produziram óvulos funcionais ou espermatozoides derivados destas espermatogônias criopreservadas, e esses gametas foram capazes de fertilizar e obter uma progênie. Cinco anos após a criopreservação de espermatogônias de truta arco-íris pelo método citado acima, Lee *et al.* (2016), observou que as espermatogônias transplantadas retomaram a espermatogênese e a ovogênese em receptores masculinos e femininos. Os espermatozoides e óvulos diferenciados geraram trutas arco-íris normais, representativas dos fenótipos do doador. Testículos inteiros de truta da Manchúria (*Brachymystax lenok*) foram criopreservados por congelamento lento (1,3 M metanol + 0,2 M trealose + 10% gema de ovo) onde foi obtido 81.0% ± 1.3% de integridade de membrana e a eficiência do transplante não diferiu significativamente entre os testículos criopreservados e frescos (Lee; Yoshizaki, 2016).

Ao comparar os protocolos de vitrificação e congelamento lento de testículo de zebrafish, Bono-mestre *et al.* (2009) observaram que o método de vitrificação foi significativamente mais eficiente do que o congelamento em termos de sobrevivência celular final (congelamento lento: 77,4%-85,5%, vitrificação: 94%). Marinović *et al.*, (2019), relataram maior viabilidade de espermatogônias de zebrafish pelo método de congelamento lento (~60%), enquanto a vitrificação imersa em agulha também rendeu altas taxas de viabilidade de espermatogônias (~50%). Importante ressaltar que neste estudo, ambos métodos foram capazes de colonizar as gônadas do receptor após o transplante intraperitoneal. Em (*Oryzias latipes*) foi criopreservado o testículo inteiro pelo método de vitrificação (etilenoglicol combinado com ficoll ou sacarose), por Seki *et al.* (2013) resultando em 44,9% de viabilidade, no qual diferenciou-se em oócitos funcionais ou espermatozoides após o transplante. Outro estudo seguindo o método de vitrificação (3 M EG + 2 M Me₂SO + 0,5 M sacarose + 0,7% BSA) de testículos juvenis inteiros de (*Gnathopogon caerulescens*) honmoroko, Higaki *et al.* (2017) obtiveram alta taxa de integridade de membrana das espermatogônias (84%) no qual diferenciou-se em espermatozoides *in vitro*.

Independentemente do método de criopreservação aplicado (vitrificação ou congelamento lento) e até da taxa de integridade de membrana pós criopreservação (35 – 84%), todos os estudos aqui citados obtiveram sucesso ao maturar as espermatogônias tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Nestes estudos foram gerados gametas funcionais, fazendo a criopreservação de espermatogônias uma ferramenta muito importante para a preservação de genótipos de interesse e de animais ameaçados de extinção.



Figura 1. Espermatogônias de Lambari (*Hyphessobrycon boulengeri*) observado em microscópio óptico em aumento 10x. Fonte: Autor, 2023

2.10. Métodos de avaliação da viabilidade das espermatogônias

A avaliação das células após a criopreservação é um procedimento fundamental que validará na determinação o sucesso do protocolo, possíveis alterações metabólicas ou estruturais das células pela exposição aos crioprotetores e as altas temperaturas tanto no momento da criopreservação como no momento do descongelamento ou aquecimento (Gosden, 2011; Vajta; Kuwayama, 2006; Kopeika *et al.*, 2005). Uma das principais causas deste processo é a ruptura da membrana celular e para isso o uso de corantes como métodos de avaliação da integridade da membrana é amplamente usado o azul de tripan (Zampolla *et al.*, 2011).

O azul de tripan é usado como tingimento das células não viáveis com um coração azul ao ser observadas no microscópio, enquanto as células viáveis não são coradas porque a membrana fica sem danos isso ajuda a distinguir facilmente as células vivas das mortas (Louis; Siegel, 2011). No entanto, a sob exposição do azul

de tripan pode ser ambíguo pelo aumento de células coradas incrementa com o passo do tempo (Hudson; Hay, 1980).

Outro método que aplica marcadores de fluorescência como o corante de inclusão o diacetato de fluoresceína (FDA) permeando as membranas plasmáticas e atravessando um processamento de hidrólises os quais são fomentados por esterases intracelulares e assim produzir fluoresceína livre. Por outro lado, o corante de exclusão o iodeto de propídio (PI) não possui permeabilidade e consegue corar as membranas das células não viáveis ao misturar com o DNA e RNA e formar uma banda fluorescente (Krishan, 1975; Edidin, 1970) em conjunto, estimando a integridade da membrana e atividade metabólica (Tsai *et al.*, 2009; Zampolla *et al.*, 2009). Dessa maneira as células viáveis são coradas de verde fluorescente pela ação do FDA e as células com dano ficam de cor vermelho por conta do PI.

Um marcador de células viáveis utilizado é o trifosfato de adenosina (ATP) (Knoll-Gellida; Babin, 2007) mediado pela ação das mitocôndrias as quais produzem a energia celular quando a respiração celular acontece. Uma forma de deliberar a atividade mitocondrial é o ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolina) e o princípio é causar a mitocôndria a redução do MTT a cristais de formazan, em consequência, em uma cor roxa mediada pela ação da enzima desidrogenase succínica (Shokrgozar *et al.*, 2007) e pode ser medida pela espectrofotometria.

Outro método para observar e mesurar os danos a nível estrutural após o processo de criopreservação e a avaliação da morfologia mediante a histologia. Essa técnica possibilita a identificação de modificações na superfície celular, perda da membrana (Borrelli *et al.*, 1986), danos dentro do núcleo (Fotakis; Timbrell, 2006) conseguindo se avaliar de maneira qualitativa ou quantitativa de acordo com o tamanho dos fragmentos de tecido. Essa avaliação é realizada mediante a microscopia eletrônica de transmissão (MET), o qual alcança uma resolução e de potência maior à microscopia de luz (Salehnia *et al.*, 2002) para o qual o tecido tem que ser incluído em blocos de resinas e cortados milimetricamente com navalha de vidro (Ham; Cormack, 1983; Beçak; Paulete, 1976).

A relação dos danos provocados pela criopreservação torna-se em uma causa importante a ser avaliada (Tatone *et al.*, 2010) essas ações incrementam a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) causando mudanças no metabolismo oxidativo (Dowling; Simmons, 2009). A excessiva produção de ERO

tem como consequência a peroxidação dos lipídios da membrana plasmática resultando na perda de fluência e a não permeabilidade (Li *et al.*, 2010). Para a análise dos ERO existem ensaios antioxidantes com métodos diretos e indiretos. Um método direto aplicado com frequência que estima a peroxidação lipídica é o ensaio de produtos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) o qual é baseado na mensuração mediante espectrofotometria no agrupamento dos produtos gerados pela peroxidação dos lipídios (Sanocka; Kurpisz, 2004). Dentre do método indireto é de uso comum e simples o ensaio de poder antioxidante redutor de ferro (FRAP) o qual a atividade antioxidante é medida de acordo com a restrição do Ferro (Benzie; Strain, 1996). O que indica menor FRAP é consequência de uma menor capacidade de ligação da ferritina ao ferro, resultante, maior quantidade de ferro livre, capaz de catalisar a geração de radicais OH, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss (Welch *et al.*, 2002).

2.11. LAMBARI (*Hyphessobrycon boulengeri*)

Os lambaris são peixes de água doce, estes peixes são comumente utilizados como iscas vivas em pesque e pagues por pescadores de espécies carnívoras (Silva *et al.*, 2011) e apresenta grande importância ecológica, contribuindo para o equilíbrio dos ecossistemas de água doce brasileiros (Garutti, 2002). Além disso, apresentam algumas características importantes para sua manutenção em laboratório, como facilidade de manejo, aceitação de alimentação artificial, alta prolificidade, crescimento rápido, atingindo a maturidade sexual em cerca de 4 meses de idade (Porto-Foresti *et al.*, 2010). Os lambaris tem sido utilizados como modelo experimental em várias áreas, como trabalhos de pesquisa de manipulação cromossômica (Adamov *et al.*, 2017), híbridos estéreis (Piva *et al.*, 2018), transplante de PGCs (Coelho *et al.*, 2019), avaliação de toxicidade de herbicidas e toxinas (Rocha, 2019) entre outros. Fazendo dos lambaris um potencial modelo para espécies nativas sul-americanas.



Figura 2. Exemplar do Lambari (*Hyphessobrycon boulengeri*). Fonte: Corrêa, et al. 2010.

2.11.1. Classificação taxonômica

Reino:	Animalia
Filo:	Chordata
Classe:	Actinopterygii
Ordem:	Characiformes
Família:	Characidae
Subfamília:	Tetragonopterinae
Espécie:	<i>H. boulengeri</i> (Eigenmann, 1907)

2.11.2. Características de *Hyphessobrycon boulengeri*

A espécie *Hyphessobrycon boulengeri* foi caracterizado por Eigenmann em 1907. É um peixe de tamanho pequeno, corpo elevado e comprimido na lateral. Apresenta a forma da cabeça triangular e variando de forma arredondada na parte final da boca. Olhos grandes e bem arredondados os quais predominam quando são de tamanho menor. Podem ser diferenciados os machos das fêmeas pela aparição de estruturas similares a ganchos que são sensíveis ao tato nas nadadeiras pélvica e anal. (Carvalho, 2006). A espécie *H. boulengeri* possui uma coloração cinza com variações de cor entre amarelo até cinza mais escuro na parte dorsal sendo a região ventral mais clara. As nadadeiras apresentam uma coloração amarelada ou avermelhadas e as escamas em alguns exemplares tem reflexão de cor azul em combinação com verde. Essa coloração dos lambaris vai depender do habitat e as condições da qualidade da água. (Carvalho, 2006)

Esta espécie de lambari foi localizada e descrita para o estado de Rio Grande do Sul por Malabarba (1989), mas tem uma distribuição geográfica ampla chegando até o estado do Rio de Janeiro. O hábitat de preferência são os riachos, lagos e lagoas de profundidade menor e com vegetação em volta são utilizados como lugares de proteção (Carvalho, 2006; Grosser; Hahn, 1981)

3. HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1. Hipótese

As cápsulas biodegradáveis possibilitarão uma criopreservação eficiente do tecido testicular em comparação com o criotubo de polipropileno.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo geral

Avaliar a eficiência das cápsulas de gelatina e hipromelose como recipientes na vitrificação de espermatozônias presentes no tecido testicular de lambari (*Hyphessobrycon boulengeri*)

3.2.2. Objetivos específicos

- Escolher o melhor protocolo de vitrificação de tecido testicular do lambari (*Hyphessobrycon boulengeri*) sobre a integridade de membrana das espermatozônias.
- Avaliar o efeito do método de vitrificação do tecido testicular de lambari (*Hyphessobrycon boulengeri*) e do recipiente utilizado (cápsula de gelatina, cápsula de hipromelose e criotubo), sobre a integridade de membrana das espermatozônias.
- Avaliar se a criopreservação em cápsulas biodegradável do tecido testicular reduz os danos causados pelo processo de criopreservação quando comparado ao criotubo, sobre a integridade de membrana, estresse oxidativo, atividade mitocondrial.

CAPÍTULO II¹

¹ Artigo elaborado conforme as normas do periódico Cryobiology

USE OF ECO-FRIENDLY RECIPIENTS FOR VITRIFICATION OF SPERMATOGONIAL CELLS

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the efficiency of the gelatin and Hypromellose capsules as recipients to vitrification of spermatogonial cells of lambari. In experiment 1, four protocols to vitrification (P1, P2, P3 and P4) were tested. The protocol P3 showed greater cell viability ($25.42 \pm 4.19\%$) in comparison with the other treatments. In experiment 2, gelatin and hypromellose capsules were evaluated in comparison with cryovials as recipients for vitrification. Variables such as concentration and cellular viability, mitochondrial activity, and oxidative stress were analyzed. Cryovials obtained higher cellular concentration in comparison to the capsules. There was similarity in cellular viability with gelatin capsules. Mitochondrial activity was not different among the treatments as was lipid peroxidation. Cryovials and hypromellose capsules obtained the highest levels of antioxidant capacity. These results indicated that biodegradable capsules have the capacity of cryopreserved testicular tissue to obtain viable spermatogonial cells, after vitrification and warming; these capsules can play an important role as an alternative of vitrification recipients.

Keywords: genetic resources; *Hyphessobrycon boulengeri*; capsule, membrane integrity.

1. Introduction

Cryopreservation allows the storage of cells and tissues at extremely low temperatures for extended periods, being widely used in genetic resource conservation and the establishment of germplasm banks [10]. Cryopreservation of spermatogonia and testicular tissue containing these primordial germ cells has gained interest [14]. Spermatogonia are diploid stem cells capable of originating either oocytes or sperm when transplanted into a host organism, allowing the reconstitution of complete lineages from the genetic information contained in the donor's testis [26].

Several studies have reported high rates of viability and production of functional gametes after transplant of cryopreserved spermatogonia and testes from fish using both slow freezing and vitrification methods [24]. However, the

conventional plastic or metal containers used in these protocols contribute to waste accumulation in the environment [29]. Gelatine and HPMC capsules are made from biodegradable polymers and are been used as an alternative for cryopreservation of genetic resources [6] e [7]. Also, the capsules have a low-cost to acquire and represents a good option to used, replaced the conventional cryovials. The use of biodegradable containers could minimize the impact on the environment, but their effectiveness in fish cell cryopreservation has not yet been investigated.

The lambari conforming the family of the Characidae, subfamily tetragonopterinae which has a great number of species of fresh water fish [3]. This fish has relevant characteristics to be used as an animal laboratory model, for their facility adaptation, faster growth and sexual maturity in four months [23]. Lambari it is been used in chromosomic manipulation investigations [1], sterile hybrids [22], and transplantation of PGCs [4].

Thus, this study evaluated the efficiency of gelatin and hypromellose pharmaceutical capsules compared to the polypropylene cryotube in the vitrification of lambari testicular tissue (*Hyphessobrycon boulengeri*) aiming at spermatogonia preservation.

2. Material and methods

2.1. Collection and euthanasia

The study was conducted in accordance with the Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal - CONCEA (National Council for Control and Animal Experimentation and approved by the Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul. Project number 43603

Twenty-four immature male of *H. boulengeri* (1-2 years old) were maintained in aquariums of polypropylene of 100 L at $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH between 7-7.5, zero levels of toxic ammonia and nitrite. Fish were fed with commercial food two times a day until the experiment begins. The animals (average weight 6.1314 ± 2.4885 g and length 8.91 ± 2.35 cm) were euthanized with a lethal dose of tricaine methane sulfonate (0.125 mg/mL, pH 7.4) [19] until the cessation of opercular movement, followed by decapitation.

The testicular tissue (average weight 0.2034 ± 0.0421 g) was collected and placed in 5% of hypochlorite for 2 minutes as part of eliminate all the blood vessels and sperm, then the tissue received 3 showers of Leibovitz L-15 medium (pH 7.8, 25°C) and placed in this medium for 20 min. Three pools of three fishes totalizing nine animals were distributed. The tissue were fragments into slices (3x3 mm) using a scalpel blade. The fragments were placed in Leibovitz L-15 medium with 10% of Fetal Bovine Serum (FBS) for 30 minutes, to avoid the dehydration. Then three fragments were randomly distributed among treatments between gelatine, hypromellose capsule and cryotube using acupuncture needles (one fragments were place in each needle)

2.2. Experimental design

The experiment design is presented at (Fig1). The aim of the Experiment 1 was to define the best protocol of vitrification for testicular tissue testing different Equilibrium solutions (ES) and vitrification solutions (VS) for testicular tissue for which were tested four protocols (P1, P2, P3 and P4) similar as related by [18] with modifications, which were divided as: ES1 (1.5 M methanol + 2.25 propylene glycol) VS1 (1.5 M methanol + 4.5 M propylene glycol), ES2 (1.5 M methanol + 2.75 M Me₂SO) VS2 (1.5 M methanol + 5.5 M Me₂SO), ES3 (1 M Me₂SO + 1.5 M ethylene glycol) VS3 (2 M Me₂SO + 2.5 M ethylene glycol) e ES4 (1.5 M propylene glycol + 1.5 M Me₂SO) VS4 (3M propylene glycol + 3 M Me₂SO).

The protocol for vitrification of testes fragments was adapted from the protocol development by Marinovic et al. [17] with modifications and the use of biodegradables capsules. Three fragments of testicular tissue were placed into three acupuncture needle (BK PLUS 0,20x15mm) and transferred to 2mL microtube containing 300 µL of Equilibrium solution for fifteen minutes and vitrification solution for 1.5 minutes Marques et al. [18]. After that time, the vitrification solution was dried using a paper towel to eliminate the excessive, the acupuncture needles were encapsulated in cryotubes of 2mL capacity and the fragments into capsules of gelatine and hypromellose and were directly plunged into liquid nitrogen.

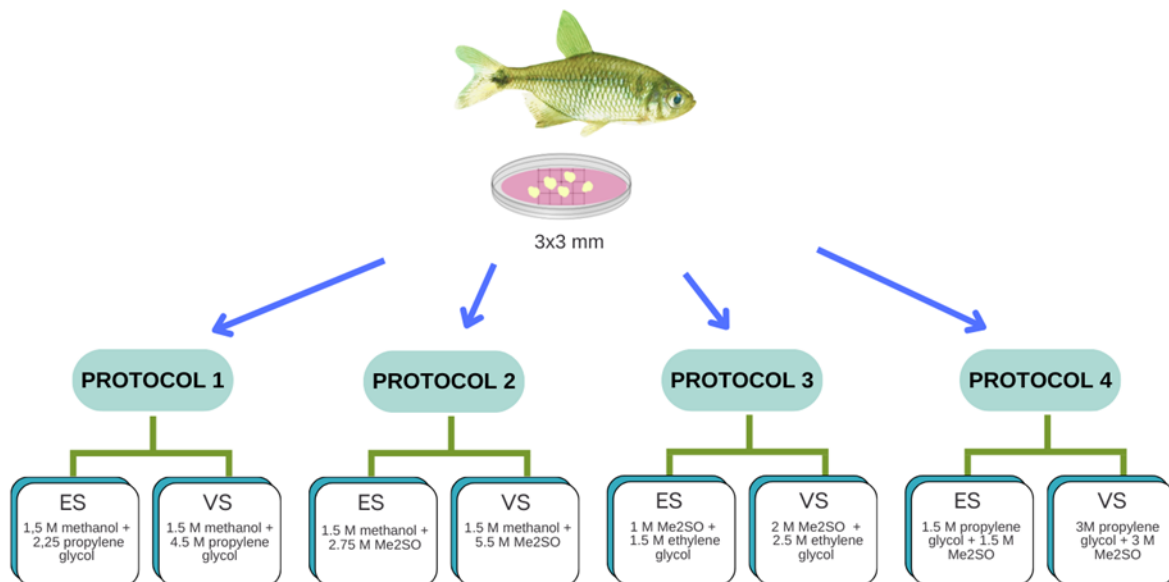


Figure 1. Experiment 1 - Protocols of vitrification tested for testicular tissue *Hyphessobrycon boulengeri*.

The objective of the Experiment 2 (Fig2) was to evaluate the efficiency of gelatin capsule (hard-gelatin capsule manufactured from beef gelatin and purified water, size 0 - Capsule Connection, Prescott, USA), Hypromellose capsule (hard-HPMC capsule manufactured from hydroxypropylmethyl cellulose and purified water, size 0 – Capsule Connection, Prescott, USA) and cryotube (2mL cryotube with external threaded manufactured from polypropylene - Corning®, New York, USA) as a recipient and form of storage for vitrification of testes fragments.

Three pools of testicular tissue of three fishes were vitrified and distributed into three experimental groups and the fresh control. After warming, enzymatic digestion was analyzed by trypan blue, mitochondrial activity by MTT assay and oxidative stress by TBARS and Ferric Reducing Antioxidant Power by FRAP. Each analysis was performed in triplicate.

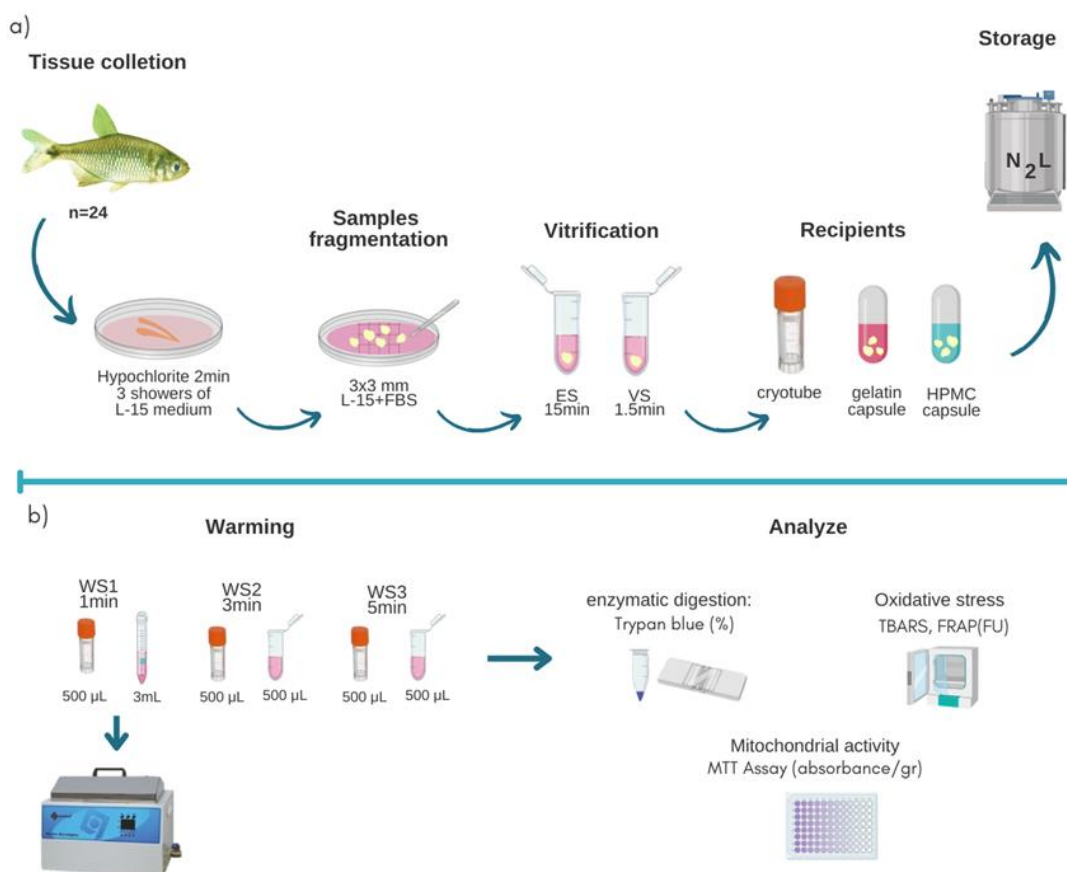


Figure 2. Experiment 2 - a) Testicular tissue of *Hypheosobrycon boulengeri* collection, fragmentation, vitrification and storage of the samples in cryotube, gelatin and hypromellose capsule, b) warming procedure with the warming solutions (WS1, WS2, WS3) and their analyze.

2.3. Vitrification of testicular pieces and warming procedure

The vitrification protocol is described in experiment 1. After seven days of storage, the cryotubes were used directly, nevertheless the capsules were inserted into plastic tube (15 mL) and the top part was broken, immediately each sample was warming in a water bath for 60s at 25°C, while the samples were exposed to the first warming solution (WS1) containing 1M of sucrose, 10% of FBS and L-15 medium, then to a second warming solution (WS2) 0.5 M sucrose, 10% of FBS and L-15 medium for 3 min and finally to a third solution containing 10% FBS and L-15 medium for 5 min. After all, the samples were washed three times in L-15 medium (pH 7.8, 25°C).

The samples were placed in 2 mL microtube containing 440 µL of L-15 medium and immediately evaluated.

2.4 Tissue digestion procedure

The three fragments of the samples were dried in a paper towel to eliminate the excess of solution, weighed and placed into 2 mL microtube with 500 μ L of L-15 medium. The fragments were cut into small pieces using small scissors. The samples were supplemented with 50 μ L (15mg/mL) of trypsin plus 10 μ L of DNase I (1mg/mL) and incubated for 1.5h at room temperature 22°C on a shake plate. The digestion process was stopped after the addition of 400 μ L of L-15 medium and 100 μ L of FBS and the contents were mixed. In order to obtain a solution, samples were filtered through 40 μ m filters into 1.5 mL microtube, and centrifuged for 20 min at 200 xg. The supernatant was removed and the pellet was resuspended in 25 μ L of L-15 medium with 10% of FBS.

2.5 Viability Assessment

The viability of the cells was determined for trypan blue, where the live cells remained without stain and the dead ones were stained.

Trypan blue in a concentration 0.04% were used. Then 10 μ L this solution and 10 μ L of the resuspended pellet were mixed in a 1.5 mL microtube and immediately analyzed. The number of live cells was counted in five fields of a Neubauer's camera using an optical microscope (Nikon Eclipse E200, Tokyo, Japan with an objective lens 40x) each sample were counted in triplicate. The viability was calculated as the recovery rate, rectified with the weight of the tissue according to Lujic et al. [16]. Where the viability (%) is expressed as the product of the relation between the number of cells isolated from the cryopreserved tissue with the number cells isolated from the fresh tissue, and the correction factor was calculated by the ratio of the weight of the fresh tissue and the weight of the cryopreserved tissue.

2.6 Mitochondrial activity

After the warming, the samples were put into 2 mL microtube and weighed, then were added 200 μ L of L-15 medium. The mitochondrial activity was evaluated by MTT assay 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium [15], each

sample was exposed to 380 μL of MTT solution (0,25mg/mL) and incubated at 28°C for 2 hours. Afterwards, with the lights off the MTT solution was removed and was added 400 μL of Me_2SO . Hence, 100 μL of the solution was put into 96 well plate in triplicate. The samples were transported into a spectrophotometer (SpectraMax® M4, Molecular Devices, San Jose, CA, USA) and the absorbance was read at 570 and 630 nm and corrected by the weight of the samples.

2.7 Oxidative stress

The samples were mixed in a cold solution of 50 mM Tris-HCl Buffer, pH 7,4 (1/10, w/v) at 4°C and centrifugated for 10 minutes at 3000 X g. The sediment of the samples was discarded and the supernatant was used to determine the levels of Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and the levels of lipidic peroxidation by the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay (TBARS). The analysis of lipidic peroxidation was delimited by the formation of thiobarbituric acid reactive species (TBARS), following the protocol of Ohkawa et al. [20]. The presence of Malondialdehyde (MDA) in the samples has a colorful reaction in contact with the thiobarbituric acid (TBA), which was measured by spectrophotometry at 532 nm. A part of the sample (60 μl) with acidic buffer (acetic acid/HCl, 100 mM, pH: 3.4), TBA 0.8% and sodium dodecyl sulfate (SDS) 8.1%) was mixed and incubated for an hour. The results indicated a standard curve of MDA which was described as nmol MDA/g.

The ability of the antioxidants to reduce Fe^{+3} to Fe^{+2} in 2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) to form Fe^{+2} -TPTZ with an absorption maximum at 595 nm [2] in the samples determine the total of antioxidant potential (FRAP). This reagent reaction was measured and prepared in fresh. Then a FRAP solution (990 μL) and the sample (10 μL) were exposed to heat water (37°C) for 15 min. The results were quantified as μg of ascorbic acid equivalents.

3. Statistical analysis

For the statistical analysis in both experiments, the data were performed by the normality (Shapiro Wilk test) and homogeneity (Bartlett test). The variables that met the statistical assumptions were subjected to one-way analysis of variance (One-Way ANOVA), followed by the Tukey test when significant difference was observed.

All the data is presented in bar graphics (mean and standard derivation). Variables that did not present normality and homogeneity were analyzed using the Kruskal-Wallis's test, followed by Dunn's test. This data is presented in Box and Whiskers graphs (median, maximum and minimum). All analyzes were performed considering a significance of 5% ($p < 0.05$). Statistical tests were performed using GraphPad Prism 3.0 software.

4. Results

4.1. Experiment 1

The cellular concentration was different ($p < 0,0001$) among the experimental groups (Fig. 3).

A highest cellular concentration was observed in protocol P3 and were different to the other protocols (P1, P2, P4), at the same time the protocols P1 and P2 showed a lowest cellular concentration.

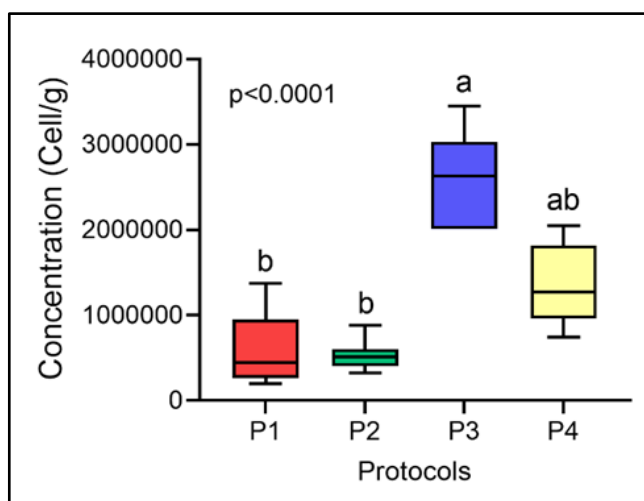


Figure 3. Spermatogonial cell concentration (cell/g) of *Hyphessobrycon boulengeri*. Spermatogonial cell concentration observed at protocols tested. P1(1.5 M methanol + 4.5 M propylene glycol), P2(1.5 M methanol + 5,5 M Me₂SO), P3(2 M Me₂SO + 2.5 M ethylene glycol) and P4(3M propylene glycol + 3 M Me₂SO). Different letters indicate differences between the groups by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn test.

The cellular viability was different ($P < 0.0010$), there is a difference among the P3 ($25.42 \pm 4.19\%$) and other treatments, P1 ($5.84 \pm 4.32\%$), P2 ($5.19 \pm 1.15\%$) and P4 ($13.16 \pm 4.8\%$) (Fig 4).

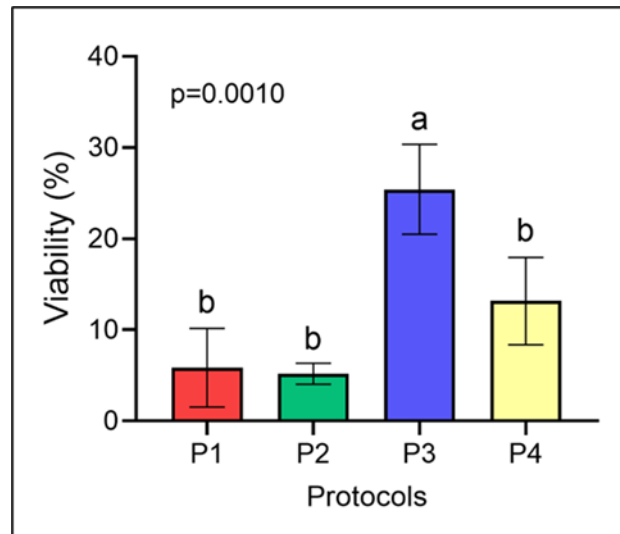


Figure 4. Cellular viability (%) observed in the testicular tissue vitrified of *Hyphessobrycon boulengeri* with the protocols tested. Different letter indicated significantly differences by Tukey test.

4.2. Experiment 2

The cellular concentration was different ($F_{(2, 24)} = 32,53$; $p < 0,0001$) among the experimental groups, as it is showed in Fig. 5. There is a difference among all the recipients of cryopreservation tested. The highest cellular concentration of spermatogonial cells, was in a cryovial group, followed of the samples cryopreserved in gelatine capsules, while the samples cryopreserved in hypromellose capsules obtained the lowest cellular concentration.

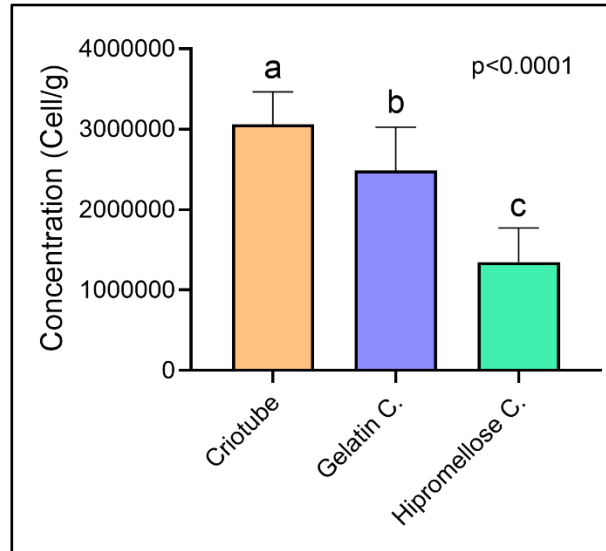


Figure 5. Spermatogonial cell concentration (Cell/g) of *Hyphessobrycon boulengeri*, recovered in cryovials, gelatin capsules and hypromellose capsules. Different letters indicate differences between groups using the ANOVA test followed by the Tukey test.

The cellular variability was different ($F_{(2, 6)} = 15,45$; $p=0,0043$) between the experimental groups (Fig 6). The greatest viability was observed in the samples cryopreserved in cryovials ($19.82 \pm 2.64\%$) and gelatin capsules ($16.09 \pm 1.58\%$), those were significantly different to the hypromellose capsules with $8.74 \pm 3.01\%$ of cellular viability.

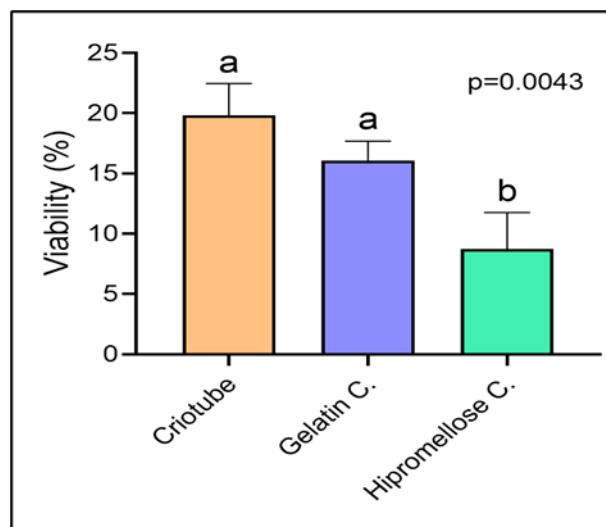


Figure 6. Cellular viability (%) observed in the testicular tissue vitrified of *Hyphessobrycon boulengeri* sustained in cryovials, gelatin capsules and hypromellose capsules. Different letters indicate significant difference using the Tukey test.

There was no difference ($F_{(3, 20)} = 0,9237$; $p=0,4474$) among the experimental groups for the mitochondrial activity after cryopreservation (Fig 7). The mitochondrial activity was varied of 12,30 to 18,41 AU/g, without difference between the groups.

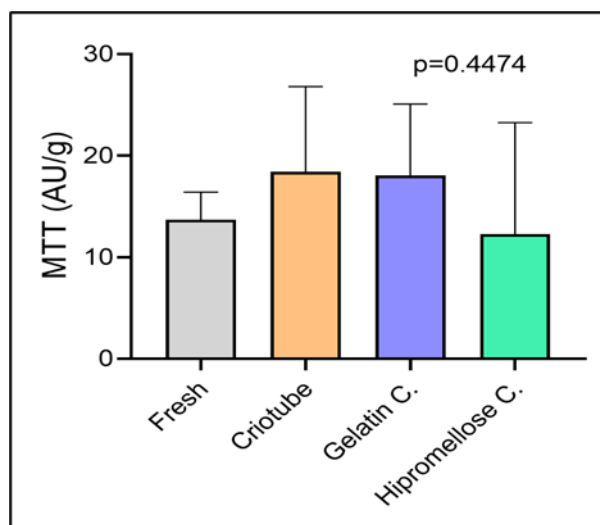


Figure 7. Mitochondrial activity observed in the testicular tissue vitrified of *Hyphessobrycon boulengeri* sustained in cryovials, gelatin capsules and hipromellose capsules. Different letters indicate significative difference using the Tukey test.

The lipidic peroxidation analyzed by the TBARS test was not different among the treatment ($p=0,1308$) that is observed at Fig 8.

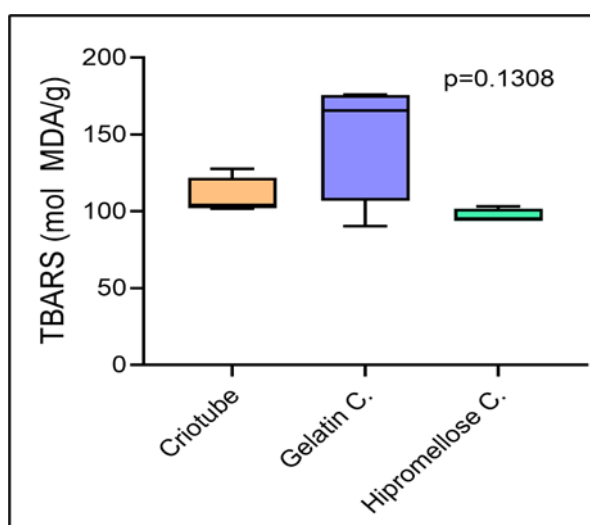


Figure 8. Lipidic peroxidation by the analysis of the Thiobarbituric Acid Reactive Substance – TBARS (mol of MDA/g) observed in the testicular tissue vitrified of *Hyphessobrycon boulengeri* sustained in cryovials, gelatin capsules and hipromellose capsules. Different letters indicate significative difference using the Tukey test.

A significant difference was observed ($F_{(2, 14)} = 6,943$; $p=0,0080$) for the antioxidative capacity measured by FRAP analysis, among the experimental groups (Fig 9). The highest values observed were in samples cryopreserved in cryovials ($57,56\pm5,99$ $\mu\text{g}/\text{Acid ascorbic}$) and the hypromellose capsules ($55,42\pm9,8$ $\mu\text{g}/\text{Acid ascorbic}$), which differed significantly from the gelatin capsule ($39,94\pm9,06$ $\mu\text{g}/\text{Acid ascorbic}$).

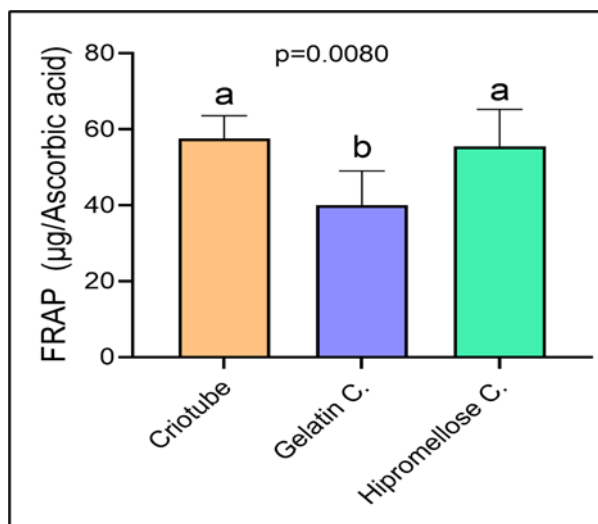


Figure 9. Antioxidant capacity measured with the method FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) observed in the testicular tissue vitrified of *Hyphessobrycon boulengeri* sustained in cryovials, gelatin capsules and hipromellose capsules. Different letters indicate significative difference by the Tukey test.

5. Discussion

Cryopreservation can maintain cells at exceptionally low temperatures with the intention to preserved their functionality [6].

Vitrification it is considered a method simple because doesn't need a sophisticated instrumental, easy to do and their accessibility in different places. After that, the use of simples and functional artifacts are fundamental for the execution of vitrification. This article proposes and validates a protocol to vitrify fish testicular tissue in low-cost, biodegradable and easily accessible medical capsules in any country. Evidently, the results obtained by [6] [7] cryopreserving sperm from different fish species and validating this artifact which motivated the development of this study. And the results obtained here, in fact, confirmed that gelatin and hypromellose capsules can also be used to vitrify fish testicular tissue.

Therefore, in Experiment 1, Using the protocol by Marques et al. [18] as a reference in *Piaractus mesopotamicus*, the time that testicular tissue was exposure to the exposition/vitrification solution was significantly important for the action of the cryoprotectants to penetrating the tissue. Is demonstrated the less toxicity [13] and high permeability of dimethylsulfoxide [27] as cryoprotectant. On the other hand, ethylene glycol has the property of being hygroscopic and mixable with polar solvents [25]. According to [16] the combination of two cryoprotectants in concentrations almost identical allows the general use of cryoprotectants in high concentrations, but in combination each one results in low quantity to be toxic for the cells. In this case, the exposure to (VS3) obtained a higher concentration of cells and viability after thawing using the trypan blue.

The experiment 2, put to test storages for vitrification of testicular tissue fragments using biodegradables capsules of gelatin e hypromellose in comparison with a cryovial. The use of this kind of product is presented as an alternative to plastic cryovials using in cryopreservation of cells or sperm of fish species forward their conservation and commercial [7]. Moreover, biodegradable capsules are obtained by a low cost of production [6].

In Experiment 2, we prove the efficient according cellular viability, mitochondrial activity of gelatin and HPCM capsules and oxidative stress of HPCM capsules after warming. The cryovials and gelatine capsules preserved similar cell concentration, which indicates that gelatine capsules can replace the cryovials for vitrification. As for the better result for cell viability after vitrification of *H. Boulengeri* testicular tissue observed in the gelatin capsule in relation to the hypromellose capsule, it may be related to its mechanical properties originating from proteins [11]. Another factor that can be considered was reported by Cole et al. [5] in studies with drug release. In this case, the authors related differential solubility and possible fragmentation of the polymer during enzymatic digestion. In recent studies, França et al. [6] was showed that the functionality of sperm of *Rhamdia quelen* after cryopreservation was maintained and able to produce viable larvae. In the same way, was demonstrated that sperm quality of Mediterranean fishes was maintained in biodegradable capsules (hard-gelatin and hard-HPMC) [7].

Mitochondria are organelles with the responsibility to provide energy to the cells in the form of ATP [12]. Eventually, the exposition to low temperatures can

causes sensibility to mitochondria organelles [29] and their validation functionality is crucial. In this study, the mitochondrial activity did not differ from the other experimental groups, that indicated that cryovials and biodegradables capsules corroborates their similarity of recipients to preserved the mitochondrial activity of the cells after thawing. In addition to there being no difference in the cell's mitochondrial activity between the types of artifacts tested, the time of equilibrium and vitrification protocol used for ovarian tissue in *Piaractus mesopotamicus* proposed by Marques et al. [18] was efficient. The results about cellular viability of the present study using acupuncture needles for vitrification were similar to those reported by Marinovic et al. [17] in spermatogonia of zebrafish.

The physiological disbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defenses can caused oxidative stress [32], this result in damage to DNA and the induction of lipid peroxidation affects the function, fluidity and membrane structure [8]. For this study, the TBARS did not differ from the treatments ($p=0.1308$) that indicates the lipid peroxidation was not detected in the samples and the cryoprotectant used Me2SO provide the reduction of osmotic and mechanical stress as was described for Wang et al [31]. The antioxidant cellular is mediated by mechanisms which the cells cancel the reactivity or inhibits the production of free radicals [28][21][9]. The results showed the samples cryopreserved in cryovials and hypromellose capsule obtained highest values in comparison with gelatin capsule by FRAP that indicates cryovials and HPMC capsules have the ability to reduce the ferric free after cryopreservation.

In the present study, the great cellular viability after vitrification/warming was demonstrated by the correct use of a protocol according to the fish species to optimize the cryopreservation of testicular tissue. Also, it was proved that biodegradables capsules can be used as an eco-friendly container and low-cost alternative.

References

- [1] N.S. Adamov, Triploid induction in the yellowtail tetra, *Astyanax altiparanae*, using temperature shock: Tools for conservation and Aquaculture. *Journal of the world Aquaculture society*, 48(2017) 741-750.
- [2] I.F. Benzie, J.J. Strain. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1996) 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- [3] H.A. Britsky. 1972. Peixes de água doce de Estado de São Paulo: Sistemática. *In* Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Uruguaí. *Poluição e Piscicultura*, São Paulo. (1972)83-108.
- [4] G.C.Z. Coelho, I.S. Yo, T.M. Mira-López, G.S. Yasui. Preparation of a fish embryo for micromanipulation: staging of development, removal of the chorion and traceability of PGCs in *Prochilodus lineatus*. *The International journal of developmental biology*. 63 (2019) 57-59. <https://doi.org/10.1387/ijdb.180348gc>
- [5] E.T. Cole, A.L. Connor, I.R. Wilding, H.U. Petereit, C. Schminke, T. Beckert, D. Cadé. Enteric coated HPMC capsules designed to achieve intestinal targeting. *International journal of pharmaceutics*, 231(2002), 83–95. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(01\)00871-7](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(01)00871-7)
- [6] T.S. França, I.C. Gomes, E.A. Sanches, M. Pérez, N. Dos Santos, T. Rodriguez, J. Lisbôa, L. Marques, A.R. Seabra, D.P. Streit. Fish sperm cryopreservation using biodegradable containers: New low-cost and environment-friendly methodology. *Reproduction*. 166(2023) 89–97. <https://doi.org/10.1530/REP-23-0046>.
- [7] T.S. França, W.A. González-López, M.P. Sanchez, L. Ferrão, F. Fernández-García, L.P. Borges, A. Belenguer, P.G. Holhorea, J.C. Caldorch-Giner, A.J. Pérez-Sánchez, D.P. Streit Jr, J.F. Asturiano. Successful cryopreservation in biodegradable containers of sperm from aquaculture Mediterranean fishes. *Theriogenology*. 216 (2024) 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.12.016>.
- [8] B.A. Freeman, J.D. Crapo. Biology of disease. Free radicals and tissue injury, *Laboratory Investigation; a journal of technical methods and pathology*. 47 (1982) 412–426. <https://europepmc.org/article/med/6290784> (accessed January 15, 2024).
- [9] R. Greenwald. Current approaches to the development of oxygen radical scavengers, *Drugs of today*, 26 (1990) 299-307
- [10] M.M. Hagedorn, J.P. Daly, V.L. Carter, K.S. Cole, Z. Jaafar, C.V.A. Lager, L.R. Parenti. Cryopreservation of Fish Spermatogonial Cells: The Future of Natural History Collections. *Scientific Report*. 8, 6149 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24269-3>
- [11] A. Jongjareonrak, S. Benjakul, W. Visessanguan, T. Prodpran, M. Tanaka. Characterization of edible films from skin gelatin of brownstripe red snapper and bigeye snapper. *Food Hydrocolloids*, 20(2006) 492–501. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.04.007>
- [12] V. Kholodnyy, S. Boryshpolets, B. Dzyuba, J. Cosson. Energetics of fish spermatozoa. *Cryopreservation of Fish Gametes*. (2020) 69–116. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4025-7_4

- [13] F. Lahnsteiner, The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Danio rerio*) embryos, *Theriogenology* 69 (2008) 384e396.
- [14] S. Lee, Y. Iwasaki, S. Shikina, G. Yoshizaki. Generation of functional eggs and sperm from cryopreserved whole testes. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, v.110, p. 1640–1645, 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218468110>.
- [15] Y. Liu, D.A. Peterson, H. Kimura, D. Schubert, Mechanism of cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) reduction, *J. Neurochem.* 69 (2002) 581–593. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69020581.x>
- [16] J. Lujčić, Z. Marinović, S. Sušnik Bajec, I. Djurdjevič, E. Kása, B. Urbányi, Á. Horváth, First successful vitrification of salmonid ovarian tissue, *Cryobiology.* 76 (2017) 154–157. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.04.005>.
- [17] Z. Marinović, J. Lujčić, E. Kása, Z. Csenki, B. Urbányi, Á. Horváth. . Cryopreservation of Zebrafish Spermatogonia by Whole Testes Needle Immersed Ultra-Rapid Cooling. *Journal of Visualized Experiments.*133 (2018) e56118. <https://doi.org/10.3791/56118>
- [18] L. Marques, A.A.N. Fossati, M.S. Leal, R.B. Rodrigues, R.A. Bombardelli, D.P. Streit Jr, Viability assessment of primary growth oocytes following ovarian tissue vitrification of neotropical teleost pacu (*Piaractus brachypomus*), *Cryobiology.* 82 (2018)118-123. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.03.009>.
- [19] M. Matthews, Z.M. Varga. Anesthesia and euthanasia in zebrafish, *ILAR J.* 53 (2012) 192–204. <https://doi.org/10.1093/ilar.53.2.192>.
- [20] H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry.* 95(1979)351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- [21] J. Palamada, J. Kehrer. Inhibition of protein carbonyl formation and lipid peroxidation by glutathione in rat liver microsomes, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 293 (1992) 103-109.
- [22] L.H. Piva, D. H. De. Siqueira-Silva, C.A.G. GOMES, T. Fujimoto, T. Saito, L.V. Dragone, J.A Senhorini, F. Porto-Foresti, J.B.S. Ferraz, G.S. Yasui. Triploid or hybrid tetra: Which is the ideal sterile host for surrogate technology? *Theriogenology.* 108 (2018) 239-244. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.12.013>
- [23] F. Porto-Foresti, D.T. Hashimoto, J. A. Senhorini, F. Foresti. Hibridação em piscicultura: monitoramento e perspectivas. *Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Universidade Federal de Santa Maria – UFSM*, 1 (2010) 589-601.
- [24] M. Pšenička, T. Sito, M. Rodina, B. Dzyuba. *et al.* Cryopreservation of early stage Siberian sturgeon *Acipenser baerii* germ cells, comparison of whole tissue and dissociated cells, *Cryobiology.* 72 (2016) 119–122. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.02.005>
- [25] S. Rebsdats, D. Mayer. Ethylene glycol, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.* 13 (2012) 552-546. https://doi.org/10.1002/14356007.a10_101
- [26] S. Seki, S. Lee, Y. Takahashi. 070 Production of donor-derived offspring by allogenic transplantation of cryopreserved spermatogonia in medaka, *Cryobiology.* 67 (2013) 417. <https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2013.09.076>

- [27] S. Seki, T. Kouya, D.M. Valdez, B. Jin, T. Hara, N. Saida, M. Kasai, K. Edashige. The permeability to water and cryoprotectants of immature and mature oocytes in the zebrafish, *Cryobiology* 54 (2007) 121e124.
- [28] P.J. Thornalley, M. Vasak. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals, *Biochimica et Biophysica Acta*, 827 (1985) 36-44. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(85\)90098-6](https://doi.org/10.1016/0167-4838(85)90098-6)
- [29] T. Tsvetkov, Z. Naydenova. Activity of ATP synthetase complex after low temperature treatment or freeze-drying of mitochondria isolated from skeletal muscles. *Cryobiology*. 24(1987) 280–284. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(87\)90031-9](https://doi.org/10.1016/0011-2240(87)90031-9)
- [30] P. Vanderzwalmen, F. Ectors, L. Grobet, Y. Prapas, Y. Panagiotidis, S. Vanderzwalmen, A. Stecher, P. Frias, J. Liebermann, N.H. Zech. Aseptic vitrification of blastocysts from infertile patients, egg donors and after IVF. *Reproductive BioMedicine Online*.19 (2009), 700-707. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2009.09.011>
- [31] X. Wang, T.-C. Hua, D.-W. Sun, B. Liu, G. Yang, Y. Cao, Cryopreservation of tissue-engineered dermal replacement in Me₂SO: Toxicity study and effects of concentration and cooling rates on cell viability, *Cryobiology*. 55 (2007) 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2007.05.006>.
- [32] E.R. West, M. Xu, T.K. Woodruff, L.D. Shea, Physical properties of alginate hydrogels and their effects on in vitro follicle development, *Biomaterials*. 28 (2007) 4439–4448. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.001>.

CAPITULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados após a vitrificação em capsulas de gelatina e hypromellose para o tecido testicular de lambari, sugerem que é uma alternativa eficiente para a preservação de espermatogônias, mantendo as células viáveis após as técnicas de validação da concentração e viabilidade celular, atividade mitocondrial e o estresse oxidativo. Essa nova alternativa de recipientes, facilmente pode reenlaçar a os criotubos usados na criopreservação e que não podem ser utilizados novamente, e tem que ser desfechados, incrementando a contaminação do ambiente. Motivo pelo qual, as capsulas podem desenvolver as funções dos criotubos e ser usados para preservar material genético, conservando a funcionalidade das células, além de ter a capacidade de biodegradação pela sua conformação e de baixo custo no mercado em comparação com os criotubos, virando um produto acessível e benéfico com o ambiente. Se estima refinar os protocolos e procedimentos com mira a melhorar a eficiência de essas opções biodegradável para futuras investigações em diversas espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS

- 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, v. 11, [art.] 29, [p. 1-10], 2011.
- ADAMOV, N. S. *et al.* Triploid Induction in the Yellowtail Tetra, *Astyanax altiparanae*, Using Temperature Shock: Tools for Conservation and Aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 48, n. 5, p. 741–750, 2017.
- AHAMMAD, M. M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B. B. The hatching of common carp (*Cyprinus carpio L.*) embryos in response to exposure to different concentrations of cryoprotectant at low temperatures. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 44, n. 2, p. 114-121, 2002.
- ALIYU, R. S. *et al.* Capsules: types, manufacturing, formulation, quality control tests and, packaging and storage - A comprehensive review. **World Journal of Pharmaceutical and Life Sciences**, Bhopal, v. 6, n. 8, p. 93-104, 2020.
- AQUINO, D. *et al.* Ovarian tissue vitrification: the use of a novel metal closed system for clinical grade cryopreservation. **JBRA Assisted Reproduction**, Brasília, DF, v. 18, n.1, p. 12-15, 2014.
- ARIGA, O. *et al.* Encapsulation of biocatalyst with PVA capsules. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 78, n. 1, p. 74-78, 1994.
- ATENCIO, V. J. *et al.* Evaluación de dimetilacetamida como crioprotector para la crioconservación de semen de bocachico *Prochilodus magdalenae*. **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 45, n. 2, p. 151-158, 2013.
- BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: LTC, 1976.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.
- BETANCOURTH, J.; CÁCERES GUTIÉRREZ, G. **Superovulación y transferencia de embriones en vacas lecheras utilizando dos protocolos hormonales**. 2011. Tesis (Grado Académico de Licenciatura) - Proyecto Especial Programa de Ingeniero Agrónomo, Carrera de Ciencia y Producción Agropecuarias, Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano, Tegucigalpa, 2011.
- BIELANSKI, A. *et al.* Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid Nitrogen. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 46, n. 2, p. 146-152, 2003.
- BIELANSKI, A.; VAJTA, G. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. **Human Reproduction**, Oxford, v. 24, n. 10, p. 2457-2467, 2009.
- BLAXTER, J. H. S. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. **Nature**, London, v. 172, n. 4391, p. 1189-1190, 1953.

BOISO, I. Principios básicos de criobiología. **Revista Iberoamericana de Fertilidad**, Madrid, v. 18, n. 4, p. 20-22, 2001.

BONE, Q. *et al.* **Biology of fishes**. Michigan: Springer, 1995.

BORRELLI, M. J.; WONG, R. S. L.; DEWEY, W. C. A direct correlation between hyperthermia-induced membrane blebbing and survival in synchronous G1 CHO cells. **Journal of Cellular Physiology**, New York, v. 126, n. 2, p. 181–190, 1986.

BRINSTER, R. L.; ZIMMERMANN, J. W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 91, n. 24, p. 11298-11302, Nov. 1994.

BRITSKY, H. A. Peixes de água doce de Estado de São Paulo: sistemática. *In*: USP. Faculdade de Saúde Pública. **Poluição e piscicultura**. São Paulo: Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Uruguaí, 1972. p. 79-108.

BURDOCK, G. A. Safety assessment of hydroxypropyl methylcellulose as a food ingredient. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 12, p. 2341-2351, 2007.

BUSTAMANTE-GONZÁLEZ, J. *et al.* Fisiología y criopreservación del espermatozoide en teleósteos. **AquaTIC**, Zaragoza, n. 53, p. 1-17, 2019.

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

CABRITA, E. *et al.* Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 432, p. 389–401, 2014.

CABRITA, E. *et al.* Post-thaw quality assessment of testicular fragments as a source of spermatogonial cells for surrogate production in the flatfish *Solea senegalensis*. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, [p. 1-15], 29 Aug. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10695-023-01232-2>. Acesso em: 23 nov. 2023.

CARMO, M. *et al.* Hatching, survival and deformities of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) embryos subjected to different cooling protocols. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 69, n. 3, p. 451-456, 2014.

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

CARVALHO, F. R. **Taxonomia das populações de *Hyphessobrycon boulengeri* (Eigenmann, 1907) e *Hyphessobrycon reticulatus* Ellis, 1911 (Characiformes: Characidae)**. 2006. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2006.

CASTILHO-ALMEIDA, R. B. ***Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) como modelo biológico de espécie de peixe para exploração zootécnica e biomanipulação**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação da CAPES, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2007.

CASTRO, S. V. *et al.* Intracellular cryoprotant agents: characteristics and use of ovarian tissue and oocyte cryopreservation. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 39, n. 2, p. 1-17, 2011.

- CLARKE, A. G. The Frozen Ark Project: the role of zoos and aquariums in preserving the genetic material of threatened animals. **International Zoo Yearbook**, London, v. 43, n. 1, p. 222–230, 2009.
- COELHO, G. C. Z. *et al.* Preparation of a fish embryo for micromanipulation: staging of development, removal of the chorion and traceability of PGCs in *Prochilodus lineatus*. **The International Journal of Developmental Biology**, Vizcaya, v. 63, n. 1/2, p. 57-65, 2019.
- CORRÊA, F.; CLAUDINO, M. C.; GARCIA, A. M. Guia fotográfico e aspectos da biologia dos principais peixes de água doce do Parque Nacional da Lagoa do Peixe, RS. **Cadernos de Ecologia Aquática**, Rio Grande, v. 6, n. 1, p. 28-43, 2010.
- CRUZ, P.; MEDINA, V.; VELASCO, Y. Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellín, v. 19, n. 2, p. 152-159, 2006.
- CULJAT, M. O. *et al.* A review of tissue substitutes for ultrasound imaging. **Ultrasound in Medicine & Biology**, Oxford, v. 36, n. 6, p. 861-873, 2010.
- DI CHIACCHIO, I. M. *et al.* Sperm quality and its freezing ability throughout the spawning season in *Prochilodus lineatus* and *Brycon orbignyanus*. **Theriogenology**, New York, v. 90, p. 284-288, 2017.
- DOMINGUEZ, L. *et al.* Optimización de un protocolo para la criopreservación del espermatóforo y masa espermática del langostino blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, Lima, v. 31, n. 3, 2020.
- DOWLING, D. K.; SIMMONS, L. W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. **Proceedings: Biological Sciences**, London, v. 276, n. 1663, p. 1737–1745, 2009.
- DUNHAM, R. A. History of biotechnology, genetics and selective breeding in aquaculture and fisheries. *In*: DUNHAM, R.A. **Aquaculture and fisheries biotechnology: genetic approaches**. 2nd ed. Alabama: Cabi International, 2011. cap. 1, p. 1-7.
- EDIDIN, M. A rapid, quantitative fluorescence assay for cell damage by cytotoxic antibodies. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 104, n. 5, p. 1303-1306, 1970.
- EIGENMANN, C. H. Preliminary descriptions of new genera and species of tetragonopterid characins. (Zoölogical Results of the Thayer Brazilian expedition.). **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**, Cambridge, v. 52, n. 6, p. 91-106, 1908.
- ELLIOT, G. D.; WANG, S.; FULLER, B. J. Cryoprotectants: a review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 76, p. 74-91, 2017.
- ESPARZA ÁLVAREZ, D. A.; PARRA JIMÉNEZ, E. R. **Evaluación de embriones a congelación lenta y vitrificación en bovinos (*Bos taurus*) en el laboratorio de biotecnología de reproducción de la carrera de medicina veterinaria y zootecnia de la Universidad Técnica de Cotopaxi**. 2015. Tesis (Grado previo en Medicina Veterinaria Zootecnista) - Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad Técnica de Cotopaxi, Latacunga, 2015.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome: FAO, 2022.

- FAUZI, M. A. R. D. *et al.* Development of potential carrageen-based hard capsule as the alternative of conventional capsules by implementing the oligomerization reaction. **Journal of Saudi Chemical Society**, London, v. 27, n. 4, p. 1-13, 2023.
- FERREIRA, P. *et al.* Intestinal and liver morphometry of the Yellow Tail Tetra (*Astyanax altiparanae*) fed with oregano oil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 2, p. 911–922, 2016.
- FORNARI, D. C. *et al.* Effect of cryoprotectants on the survival of cascudo preto (*Rhinelepis aspera*) embryos stored at - 8°C. **Zygote**, Ottawa, v. 22, n. 1, p. 58-63, 2011.
- FORNARI, D. C. *et al.* Increasing storage capability of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos by chilling: development of a useful methodology for hatcheries management. **Cryo Letters**, London, v. 33, n. 2, p. 125-134, 2012.
- FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 160, n. 2, p. 171–177, 2006.
- FRANÇA, T. *et al.* Fish sperm cryopreservation using biodegradable containers: new low-cost and environment-friendly methodology. **Reproduction**, Bristol, v. 166, n. 2, p. 89–97, 2023.
- FULLER, B.; PAYNTER, S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. **Reproductive Biomedicine Online**, Cambridge, v. 9, n. 6, p. 680-691, 2004.
- GALO, J. M. *et al.* Spermatic abnormalities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) after cryopreservation. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 71, n. 6, p. 693-699, 2011.
- GARCÍA GALLARDO, M. V.; MONTENEGRO TROYA, L. F. **Evaluación de la crioconservación de embriones bovinos (*bos taurus*) por dos métodos de descenso de temperatura en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi**. 2014. Tesis (Grado previo en Medicina Veterinaria Zootecnista) - Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad Técnica de Cotopaxi, Latacunga, 2014.
- GARUTTI, V. Revalidação de *Astyanax rupununi* Fowler, 1914 (Teleostei, Characidae) e descrição de duas espécies novas para o gênero. **Papéis Avulsos de Zoologia**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 1-9, 2003.
- GHOSH, T.; JASTI, B. **Theory and practice of contemporary pharmaceuticals**. Boca Raton: CRC Press, 2005.
- GONÇALVES, L. U. **Lipídios e ácidos graxos no desempenho reprodutivo e zootécnico de lambaris (*Astyanax altiparanae*)**. 2010. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- GONZÁLES, J. *et al.* Efecto de la sustancia crioprotectora y nivel de glucosa sobre la viabilidad de embriones de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) conservados a -14 °C. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellín, v. 24, p. 384, 2011.

- GONZALEZ, J. S.; ALVAREZ, V. A. Mechanical properties of polyvinylalcohol/hydroxyapatite cryogel as potential artificial cartilage. **Journal of the Mechanical Behavior of biomedical Materials**, Amsterdam, v. 34, p. 47-56, 2014.
- GONZÁLEZ SARMIENTO, E.; DÍAZ SARMIENTO, J. Principios básicos de la criopreservación de esperma de peces. *In*: INPA. **Fundamentos de acuicultura continental**. 2. ed. Santafé de Bogotá: Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura -INPA, 2001. cap. 11, p. 253-264.
- GOSDEN, R. Cryopreservation: a cold look at technology for fertility preservation. **Fertility and Sterility**, New York, v. 96, n. 2, p. 264-268. 2011.
- GROßFELD, R. *et al.* New aspects of boar semen freezing strategies. **Theriogenology**, New York, v. 70, p. 1225-1233, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.017>. Acesso em: 14 mar. 2024.
- HAGEDORN, M. M. *et al.* Cryopreservation of fish spermatogonial cells: the future of natural history collections. **Scientific Reports**, London, v. 8, [art.] 6149, [p. 1-11], 2018.
- HAM, A. W.; CORMACK, D. H. **Histologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983.
- HAMAWAKI, A.; KUWAYAMA, M.; HAMANO, S. Minimum volume cooling method for bovine blastocyst vitrification. **Theriogenology**, New York, v. 51, n. 1, p. 165, 1999.
- HASSAN, C. M.; PEPPAS, N. A. Structure and applications of poly (Vinyl Alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. *In*: FINCH, C. A. (ed.). **Bio-polymers, PVA hydrogels, anionic polymerization, nanocomposites**. Berlin: Springer, 2000. (Advances in polymer science, v. 153). p. 37-65.
- HAYASHI, C. *et al.* Frequência de arraçoamento para alevinos de lambari do rabo amarelo (*Astyanax bimaculatus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 33, n. 1, p. 21–26, 2004.
- HIGAKI, S. *et al.* Successful vitrification of whole juvenile testis in the critically endangered cyprinid honmoroko (*Gnathopogon caeruleus*). **Zygote**, Ottawa, v. 25, n. 5, p. 652–661, 2017.
- HIGUCHI, K. *et al.* Colonization, proliferation, and survival of intraperitoneally transplanted yellowtail *Seriola quinqueradiata* spermatogonia in nibe croaker *Nibea mitsukurii* recipient. **Fisheries Science**, Tokyo, v. 77, n. 1, p. 69–77, 2011.
- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, n. 1/3, p. 3-22, 2000.
- HUDSON, L.; HAY, F. C. **Practical immunology**. 2nd ed. Oxford: Blackwell, 1980.
- ISACHENKO, V. *et al.* Effective method for in-vitro culture of cryopreserved human ovarian tissue. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 13, n. 2, p. 228–234, 2006.
- JOBLING, M. Fish: an introduction. *In*: JOBLING, M. **Environmental biology of fishes**. London: Chapman & Hall, 1995. cap. 1, p. 1-6.
- JONDET, M.; DOMINIQUE, S.; SCHOLLER, R. Effects of freezing and thawing on mammalian oocyte. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 21, n. 2, p.192-199, 1984.

KAPOOR, D. An alternative to gelatin capsule shell- A review. **International Journal of Applied Pharmaceutical and Biological Research**, [India], v. 1, n. 1, p. 74-82, 2006.

KASAI, M.; MUKAIDA, T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 9, n. 2, p. 164-170, 2004.

KNOLL-GELLIDA, A.; BABIN, P. J. Zebrafish ovarian follicle transcriptome. *In*: BABIN, P. J.; CERDÀ, J.; LUBZENS, E. (ed.). **The fish oocyte: from basic studies to biotechnological applications**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 77-97.

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.

KRISHAN, A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 66, n. 1, p. 188–193, 1975.

KUWAYANA, 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. 5, p. 608–614, 2005.

LACERDA, S. M. S. N. *et al.* A new and fast technique to generate offspring after germ cells transplantation in adult fish: the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, n. 5, [art.] e10740, [p. 1-9], 2010.

LACERDA, S. M. S. N. *et al.* Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 39, n. 1, p. 3–11, 2013.

LACERDA, S. M. S. N.; COSTA, G. M. J.; FRANÇA, L. R. Biology and identity of fish spermatogonial stem cell. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 207, p. 56-65, 2014.

LEE, S. *et al.* Generation of functional eggs and sperm from cryopreserved whole testes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 110, n. 5, p. 1640–1645, 2013.

LEE, S.; IWASAKI, Y.; YOSHIZAKI, G. Long-term (5 years) cryopreserved spermatogonia have high capacity to generate functional gametes via interspecies transplantation in salmonids. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 73, n. 2, p. 286–290, 2016.

LEE, S.; YOSHIZAKI, G. Successful cryopreservation of spermatogonia in critically endangered Manchurian trout (*Brachymystax lenok*). **Cryobiology**, Amsterdam, v. 72, n. 5, p.165–168, 2016.

LEN, J. S.; WEN, S. D. K.; SHI-XIONG, T. The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. **Bioscience Reports**, London, v. 39, n. 8, p. 1-25, 2019.

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

LIEBERMANN, J. *et al.* Potential importance of vitrification in reproductive medicine. **Biology of Reproduction**, New York, v. 67, n. 6, p. 1671-1680, 2002.

- LIEBERMANN, J.; TUCKER, M. J. Vitrifying and warming of human oocytes, embryos and blastocysts: vitrification procedures as an alternative to conventional cryopreservation. *In*: SCHATTEN, H. (ed.). **Germ cell protocols**. Totowa: Humana Totowa, 2004. (Methods in Molecular Biology, v. 254). v. 2, p. 345-364.
- LOKEN, S. D.; DEMETRICK, D. J. A novel method for freezing and storing research tissue bank specimens. **Human Pathology**, Philadelphia, v. 36, n. 9, p. 977–980, 2005.
- LOPERA, N. M. Conservation of *Brycon orbignyanus* natural populations and stocks for their reproductive, genetic, environmental sustainability: A model for species threatened with extinction. **Ciencia e Investigación Agraria**, Santiago, v. 36, n. 2, p. 191-208, 2009.
- LOUIS, K. S.; SIEGEL, A. C. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *In*: STODDART, M. J. (ed.). **Mammalian cell viability**. Totowa: Cifton, 2011. (Methods in Molecular Biology, v. 740). v. 2, cap. 2, p. 7-12.
- LOVELOCK, J. E.; BISHOP, M. W. Prevention of freezing injury to cells by dimethyl sulfoxide. **Nature**, London, v. 183, n. 4672, p.1394-1395, 1959.
- LUCKAHAN, G. E.; PILLAI, C. K. S. Biodegradable polymers – A review on recent trends and emerging perspectives. **Journal of Polymers and the Environment**, New York, v. 19, p. 637-676, 2011.
- MAGNOTTI, C. *et al.* Cryopreservation and vitrification of fish semen: a review with special emphasis on marine species. **Reviews in Aquaculture**, Richmond, v. 10, n. 1, p. 15–25, 2016.
- MALABARBA, L. R. Monophyly of the *Cheirodontinae*, characters and major clades (*Ostariophysi*, *Characidae*). *In*: MALABARBA, L. R. *et al.* **Phylogeny and classifications of neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1988. p. 193-234.
- MARINOVIĆ, Z. *et al.* Cryosurvival of isolated testicular cells and testicular tissue of tench *Tinca tinca* and goldfish *Carassius auratus* following slow-rate freezing. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 245, p. 77–83, 2016.
- MARINOVIĆ, Z. *et al.* Preservation of zebrafish genetic resources through testis cryopreservation and spermatogonia transplantation. **Scientific Reports**, London, v. 9, [art.] 13861, [p. 1–10], 2019.
- MARQUEZ, L. S. *et al.* Slow freezing versus vitrification for the cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian tissue. **Scientific Reports**, London, v. 9, [art.] 15353, [p. 1-11], 2019.
- MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S. P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology of Reproduction**, New York, v. 54, n. 5, p.1059–1069, 1996.
- MATSUMOTO, K. *et al.* Criopreservação e embriogênese somática de calos de *Dimocarpus longan*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, p.1261-1263, 2004.
- MAZUR, P. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. *In*: International congress on animal reproduction and artificial insemination, 9., 1980, Madrid. [**Proceedings of the...**]. Madrid: Zootechnia, 1980. p. 99-114.
- MAZUR, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 251–272, 1997.

- MELLO, F. *et al.* DNA isolation from fresh and cryopreserved semen of Tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Fisheries Sciences**, Turkey, v. 10, n. 2, p. 21-24, 2016.
- MEURER, F. *et al.* Nível de arraçoamento para alevinos de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax bimaculatus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 34, n. 6, p. 1835–1840, 2005.
- MIZUKAMI, A.; CARRELL, D. T.; PETERSON, C. M. Cryopreservation of embryos. **Encyclopedia of Reproduction**, San Diego, v. 1, p. 765-772, 1999.
- MOLYNEAUX, K.; WYLIE, C. Primordial germ cell migration. **The International Journal of Developmental Biology**, Vizcaya, v. 48, n. 5/6, p. 537-544, 2004.
- MOMOZAWA, K. *et al.* A new vitrification device that absorbs excess vitrification solution T adaptable to a closed system for the cryopreservation of mouse embryos. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 88, p. 9-14, 2019.
- MOMOZAWA, K. *et al.* Efficient vitrification of mouse embryos using the Kitasato Vitrification System as a novel vitrification device. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 15, n. 29, p. 1–9, 2017.
- MULDREW, K.; MCGANN, L. E. The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. **Biophysical Journal**, Cambridge, v. 66, n. 2, p. 532-541, 1994.
- MYCOCK, D. J.; WESLEY-SMITH, J.; BERJAK, P. Cryopreservation of somatic embryos of four species with and without cryoprotectant pre-treatment. **Annals of Botany**, Oxford, v. 75, n. 4, p. 331-336, 1995.
- NAHIDUZZAMAN, M. D. *et al.* Sperm cryopreservation of the Indian major carp, *Labeo calbasu*: effects of cryoprotectants, cooling rates and thawing rates on egg fertilization. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 136, n. 1/2, p. 133-138, 2012.
- NING, L. *et al.* Spermatogonial stem cells as a source for regenerative medicine. **Middle East Fertility Society Journal**, London, v. 17, n. 1, p. 1-7, 2012.
- OATLEY, J. M.; BRINSTER, R. L. The germline stem cell niche unit in mammalian testes. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 92, n. 2, p. 577-595, 2012.
- OKUTSU, T. *et al.* Manipulation of fish germ cell: Visualization, cryopreservation and transplantation. **The Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 52, n. 6, p. 685–693, 2006.
- ORFÃO, L. H. *et al.* Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 311, n. 1/4, p. 241-247, 2011.
- PAIVA, C. M. *et al.* Characterization of undifferentiated spermatogonia and the spermatogonial niche in the lambari fish *Astyanax altiparanae*. **Theriogenology**, New York, v. 96, p. 97-102, 2017.
- PAIVA, R. De invasor a hóspede. **Globo Rural**, [São Paulo], v. 11, n. 142, p. 48-53, 1997.

PARMEGIANI, L.; COGNIGNI, G. E.; FILICORI, M. Vitrification carriers and European regulation. **Fertility and Sterility**, New York, v. 97, n. 5, [art.] e24, [p. 27], 2012.

PAZ, H. M. Criopreservación de gametos y embriones. *In*: CARRILLO, M. A. (coord.). **La reproducción de los peces**: aspectos básicos y sus aplicaciones en la acuicultura. Madrid: Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura, 2009. cap. 7, p. 477-530.

PILLAI, C. K. S. Challenges for Natural monomers and polymers: novel design strategies and engineering to develop advanced polymers. **Designed Monomers and Polymers**, Utrecht, v. 13, n. 2, p. 87–121, 2010.

PIVA, L. H. *et al.* Triploid or hybrid tetra: Which is the ideal sterile host for surrogate technology? **Theriogenology**, New York, v. 108, p. 239-244, 2017.

PLATTNER, H. *et al.* Freeze etching of cells without cryoprotectants. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 53, p. 116-126, 1972.

PODCZECK, F.; JONES, B. E. **Pharmaceutical capsules**. 2nd ed. London: Pharmaceutical Press, 2004.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, London, v. 164, n. 4172, p. 666, 1949.

PORTO-FORESTI, F. *et al.* Hibridação em piscicultura: monitoramento e perspectivas. *In*: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (org). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 2. ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2010. v. 1, p. 589-601.

PŠENIČKA, M. *et al.* Cryopreservation of early stage Siberian sturgeon *Acipenser baerii* germ cells, comparison of whole tissue and dissociated cells. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 72, n. 2, p. 119–122, 2016.

PUDJIASTUTI, P.; FAUZI, M. A. R. D.; DARMOKOESOEMO, H. Drug delivery hard shell capsules from seaweed extracts. **Journal of Chemical Technology and Metallurgy**, Sofia, v. 52, n. 6, p.1140–1144, 2017.

RESTREPO-BETANCUR, G.; MONTOYA PÁEZ, J.; ARBOLEDA CHACÓN, L. Evaluación de dos crioprotectores y tres curvas de congelación programable en la criopreservación de semen de *Brycon henni* (Pisces: Characidae). **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, Lima, v. 28, n. 3, p. 597-605, 2017.

RODRÍGUEZ AGÜERA, M. *et al.* Comparación de las tasas de supervivencia de la vitrificación versus la congelación lenta para la crioconservación embrionaria en reproducción asistida. **Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana**, Madrid, v. 29, n. 2, [art.] 129, [p. 1-10], 2012.

RUSSELL, L. D. *et al.* **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Clearwater: Cache River Press, 1990.

SALEHNIA, M.; MOGHADAM, E. A.; VELOJERDI, M. R. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, New York, v. 78, n. 3, p. 644–645, 2002.

SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 2, p. 12-19, 2004.

- SANTIAGO-MORENO, J.; GALARZA LUCERO, D. A. Criopreservación de espermatozoides en especies domésticas y silvestres: estado actual de los avances tecnológicos. **Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal**, Cuenca, v. 3, n. 2, p. 18-38, 2019.
- SEKI, S. *et al.* 070 Production of donor-derived offspring by allogenic transplantation of cryopreserved spermatogonia in medaka. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 67, n. 3, p. 417, 2013.
- SHANG, M. *et al.* Testicular germ line cell identification, isolation, and transplantation in two North American catfish species. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 44, n. 2, p. 717-733, 2018.
- SHOKRGOZAR, M. A. *et al.* Comparison of two staining assays; trypan blue and MTT in vitro evaluation of human calprotectin proliferation inhibition on human gastric cancer cells. **Kowsar Medical Journal**, Tehran, v. 12, n. 2, p. 127-137, 2007.
- SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W. F. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 169, p. 2-5, 2016.
- SILVA, N. J. R. *et al.* Avaliação do potencial do mercado consumidor de lambari da Baixada Santista. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 41, n. 12, p. 5-13, 2011.
- SIROL, R. N.; BRITTO, S. G. Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. *In*: NOGUEIRA, M. G.; HENRY, R.; JORCIN, A. **Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata**. São Carlos: RIMA, 2005, p. 10-20.
- SRIVIDYA, B. *et al.* Capsules and It's technology: an overview. **International journal of pharmaceutics and Drug Analysis**, Kanigiri, v. 2, n. 9, p. 727-733, 2014.
- STREIT JÚNIOR, D. P. Biotecnologias aplicas à piscicultura. *In*: WORKSHOP SOBRE JUNDIÁ: HISTÓRIAS E PERSPECTIVAS, 2013, Passo Fundo. [Trabalhos apresentados]. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2013. v. 1, p. 152-163.
- STREIT JÚNIOR, D. P. *et al.* Criopreservação de embriões de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 28, n. 1, p. 54-62. 2004.
- STREIT JÚNIOR, D. P. *et al.* Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 42, n. 8, p. 1199-1202, 2007.
- TATONE, C. *et al.* Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. **Gynecological Endocrinology**, Abingdon, v. 26, n. 8, p. 563-567, 2010.
- TEDESCO, P. A. *et al.* A global database on freshwater fish species occurrence in drainage basins. **Scientific Data**, London, v. 4, [art.] 170141, [p.1-6], 2017.
- TEMPLE, M. D.; PERRONE, G. G.; DAWES, I. W. Complex cellular responses to reactive oxygen species. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 15, n. 6, p. 319-326, 2005.
- THANAWALA, A. J.; SONAWANEF, S. A.; SANE, C. R. Feasibility of using hard gelatin capsules for the packaging and deep-freezing of bull semen. **Theriogenology**, New York, v. 29, n. 4, p. 921-929, 1988.

TIERSCH, T. R. Strategies for commercialization of cryopreserved fish semen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 37, p. 15-19, 2008.

TRIEU, H.; QUTUBUDDIN, S. Poly (vinyl alcohol) hydrogels: 2. Effects of processing parameters on structure and properties. **Polymer**, Oxford, v. 36, n. 13, p. 2531-2539, 1995.

TRINDADE, C. **Amidas, sacarídeos e ATP exógeno na criopreservação do esperma da espécie em perigo de extinção piracanjuba, *Brycon orbignyanus***. 2019.

Tese (Doutorado em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2019.

TSAI, S.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Development of cryopreservation protocols for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles using controlled slow cooling. **Theriogenology**, New York, v. 71, n. 8, p. 1226–1233, 2009.

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.

VAJTA, G. Vitrification in human and domestic animal embryology: work in progress. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 25, n. 5, p. 719-727, 2013.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, New York, v. 65, n. 1, p. 236–244, 2006.

VANDERZWALMEN, P. *et al.* Aseptic vitrification of blastocysts from infertile patients, egg donors and after IVF. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 19, n. 5, p. 700-707, 2009.

VAZZOLER, A. E. A. M.; MENEZES, N. A. Síntese de conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (*Teleostei, Ostariophysii*). **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 52, n. 4, p. 627-640, 1992.

VISHVESH, K. B.; DOSHI, S. M.; PATEL, V. P. Duocap: the capsule in capsule technology. **International Research Journal of Pharmacy**, Kankhal, v. 6, n. 2, p. 86–89, 2015.

VIVEIROS, A. *et al.* Effects of extenders, cryoprotectants and freezing methods on sperm quality of the threatened Brazilian freshwater fish pirapitinga do sul *Brycon opalinus* (Characiformes). **Theriogenology**, New York, v. 78, n. 2, p. 361-368, 2012.

VOLPEDO, A.; THOMPSON, G. Environmental changes on freshwater fish communities in South America in the last five decades: a case study in northeast Argentina. **Sustainability, Agri, Food and Environmental Research**, Lund, v. 4, n. 3, p. 44–59, 2016.

VROMAN, I.; TIGHZERT, L. Biodegradable Polymers. **Materials**, Basel, v. 2, n. 2, p. 307-344, 2009.

WELCH, K.D. *et al.* Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 32, n. 7, p. 577-583, 2002.

WILLIAMS, R. *et al.* V. Method to recover a lipophilic drug from hydroxypropyl methylcellulose matrix tablets. **AAPS PharmSciTech**, Arlington, VA, v. 2, n. 2, [art.] E8, [p.1-8], p. 1-9, 2001.

WOLTJES, J. R.; MEIMA, H. R.; BUWALDA, P. L. **Composition based on cross-linked starch and depolymerized starch suitable as gelatin replacement**. Assignee: Cooperative Verkoop-en Productievevereniging van Aardappelmeel en Derivaten AVEBE B. A., Veendam (NL). US6749880B1. Deposit: 28 Jan. 2000. Concession: 15 Jun. 2004.

XING, Y.; JONES, P.; DONNISON, L. Characterisation of nature-based solutions for the built environment. **Sustainability**, Basel, v. 9, n. 1, [art.] 149, [p. 1-20], 2017.

YASUI, G. S. *et al.* Improvement of gamete quality and its short term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. **Animal**, Cambridge, v. 9, n. 3, p. 464-470, 2014.

YOSHIZAKI, G. *et al.* Spermatogonial transplantation in fish: a novel method for the preservation of genetic resources. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 55–61, 2011.

ZAMPOLLA, T. *et al.* Effect of methanol and Me₂SO exposure on mitochondrial activity and distribution in stage III ovarian follicles of zebrafish (*Danio rerio*). **Cryobiology**, Amsterdam, v. 59, n. 2, p. 188–194, 2009.

ZAMPOLLA, T. *et al.* Impact of cryoprotectants and cryopreservation on metabolic activity and cytoskeleton proteins of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian fragments. **Cryo Letters**, London, v. 32, n. 6, p. 525–536, 2011.

ZHANG, Y. *et al.* Genetic diversity and differentiation of Chinese domestic buffalo based on 30 microsatellite markers. **Animal Genetics**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 569-575, 2007.

ZHANG, Y. Z. *et al.* Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. **Theriogenology**, New York, v. 60, n. 5, p. 989-996, 2003.

APÊNDICE

Apêndice 1 – Normas do periódico *Cryobiology*

Guide for Authors

Introduction

The Official Journal of the Society for Cryobiology

Types of articles

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

Regular papers will describe experimental findings, techniques, or theory. They will consist of an abstract that summarizes the objective of the study, the methods used, and the conclusions reached. Abstracts should not exceed 250 words and should be adequate for direct presentation to abstracting services. After the abstract a list of up to 10 keywords that will be useful for indexing or searching must be included. The Introduction will contain a statement of the purpose of the work, the problem that stimulated it, and a brief summary of relevant published investigations. The Materials and Methods section must be presented in sufficient detail to enable other investigators to repeat the work. The Results should be concise and should avoid redundant tables and figures illustrating the same data. The Discussion should interpret the results, with minimal recapitulation of findings. Brief Communications are concise reports of original findings, techniques or theory and include an abstract no longer than 150 words and a list of up to 10 keywords. They are not divided into sections. As a guideline it is suggested that there should be no more than 3 tables and/or figures and a maximum of 10 references. The total length, including references, should not exceed 2500 words. Reviews should only be submitted after first discussing the article with the Editor or a member of the Editorial Board. As with regular papers and brief communications, reviews will be subject to peer review. Letters to the Editor should concern matters of general interest to the readership of the journal or papers recently published in the journal. Authors of papers that are the subject of comment will be given an opportunity to reply. Letters may not exceed 1 printed page in length and if publication deadlines are pressing, proofs may not be provided. The Editor's decision will be final.

Contact details for submission

Please submit your article via <https://www.editorialmanager.com/cryo>.

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

Professor Janet A.W. Elliott E-mail: cryobiology.journal@ualberta.ca

Submission checklist

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

Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

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

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

Ethics in publishing

Please see our information on Ethics in publishing.

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms sex and gender should be used correctly. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed. All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

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

Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

Preprints

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

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Reporting sex- and gender-based analyses

Reporting guidance

For research involving or pertaining to humans, animals or eukaryotic cells, investigators should integrate sex and gender-based analyses (SGBA) into their research design according to funder/ sponsor requirements and best practices within a field. Authors should address the sex and/or gender dimensions of their research in their article. In cases where they cannot, they should discuss this as a limitation to their research's generalizability. Importantly, authors should explicitly state what definitions of sex and/or gender they are applying to enhance the precision, rigor and reproducibility of their research and to avoid ambiguity or conflation of terms and the constructs to which they refer (see Definitions section below). Authors can refer to the Sex and Gender Equity in Research (SAGER) guidelines and the SAGER guidelines checklist. These offer systematic approaches to the use and editorial

review of sex and gender information in study design, data analysis, outcome reporting and research interpretation - however, please note there is no single, universally agreed-upon set of guidelines for defining sex and gender.

Definitions

Sex generally refers to a set of biological attributes that are associated with physical and physiological features (e.g., chromosomal genotype, hormonal levels, internal and external anatomy). A binary sex categorization (male/female) is usually designated at birth ("sex assigned at birth"), most often based solely on the visible external anatomy of a newborn. Gender generally refers to socially constructed roles, behaviors, and identities of women, men and gender-diverse people that occur in a historical and cultural context and may vary across societies and over time. Gender influences how people view themselves and each other, how they behave and interact and how power is distributed in society. Sex and gender are often incorrectly portrayed as binary (female/male or woman/man) and unchanging whereas these constructs actually exist along a spectrum and include additional sex categorizations and gender identities such as people who are intersex/have differences of sex development (DSD) or identify as non-binary. Moreover, the terms "sex" and "gender" can be ambiguous—thus it is important for authors to define the manner in which they are used. In addition to this definition guidance and the SAGER guidelines, the resources on this page offer further insight around sex and gender in research studies.

Changes to authorship

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

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use

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

Author rights

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

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

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

Elsevier Researcher Academy

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

Submission

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

Preparation

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our Support Center.

Peer review

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

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to

hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on electronic artwork.

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

Manuscripts must be prepared in double or triple line spacing and lines must be numbered. In Word files, continuous line numbering can be found under File - Page Setup - Layout - Line numbers - Add line numbering - Continuous. Pages should be numbered in consecutive order.

LaTeX

You are recommended to use the latest Elsevier article class to prepare your manuscript and BibTeX to generate your bibliography. Our Guidelines has full details.

Subdivision

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

Brief Communications should not be divided into sections.

Introduction

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

Material and methods

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

Results

Results should be clear and concise.

Avoid redundant tables and figures illustrating the same data.

Discussion

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

Essential title page information

- ***Title***. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations***. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide

the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.

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

Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the example Highlights.

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts of Regular Papers should not exceed 250 words, abstracts of Brief Communications should not exceed 150 words.

Graphical abstract

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

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 10 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article. Use the latest version of the American Chemical Society Style Guide, available at <http://pubs.acs.org/styleguide/>. The preferred abbreviation for dimethyl sulfoxide is Me₂SO.

Acknowledgements

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

Formatting of funding sources

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

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

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

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

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

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI. Temperatures should be expressed on the Celcius scale. Where relevant, Kelvin units may be used, but the equivalent in degrees Celcius must be added in parentheses

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

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

Artwork

Electronic artwork

General points

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

A detailed guide on electronic artwork is available. You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

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

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

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

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

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

Tables

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

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

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

Data references

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

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue. Reference management software Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>). Using the word processor plug-ins from these products,

authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Reference style

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

List: The list of references is arranged alphabetically and then numbered (numbers in square brackets).

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *Heliyon* 19 (2018) e00205, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, how to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Journal names should be abbreviated according to CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Video

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

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

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

Research data

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

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

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

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

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

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

Data statement

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

Online proof correction

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

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

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

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

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

Anexo



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 43603

Título: CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDOS GONADAIS DE PEIXES EM CAPSULA BIODEGRADÁVEL

Vigência: 24/01/2023 à 30/01/2026

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

DANILO PEDRO STREIT - coordenador desde 24/01/2023

Karel Gelina Torres Lozano - desde 24/01/2023

Thaiza Rodrigues de Freitas - desde 24/01/2023

Raquel Santos dos Santos - desde 24/01/2023

A Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião virtual realizada pelo Mconf, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 672 machos e 311 fêmeas da espécie Danio rerio (Zebrafish), de 90-180 dias de idade, provenientes de loja comercial Delphis Aquários Atacado e Varejo Ltda (CNPJ 00.187.830/0001-70); 98 machos da espécie Hyphessobrycon boulengeri (Lambari), um ano de idade, e 133 machos e 25 fêmeas da espécie Brycon orbignyanus (Piracanjuba), um ano de idade, provenientes de criador comercial Piscicultura Panamá (CNPJ 01.392.974/0001-20), de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Quarta-Feira, 5 de Julho de 2023



Documento assinado digitalmente

MAITE DE MORAES VIEIRA

Data: 13/07/2023 16:04:15-0300

Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

MAITE DE MORAES VIEIRA
Coordenador da comissão de ética

VITA

Karel Gelina Torres Lozano, peruana, nascida na cidade de Tarapoto, província e região de San Martín-Perú um dia 14 de novembro de 1996, filha mais nova de Flor Magnolia Lozano Díaz e Willer Francisco Torres Sánchez. Concluiu o ensino fundamental na escola 0620 Aplicación e o ensino médio no colégio 0554 Aplicación em 2013. Em 2019 se graduou no curso de Medicina Veterinária na Universidad Nacional de San Martín (UNSM). Após a graduação, trabalho na área de clínica de cães e gatos até finais de 2020 que conheceu o mundo da aquicultura e o interesse na área cresceu. Em 2021 iniciou o estágio no laboratório de Investigación e Análisis (LIA) no CITEacuícola e pesqueiro Ahuashiyacu pertencente ao Ministério da Produção, trabalhando na área de identificação e classificação de parasitas em peixes amazônicos. Em 2022 foi aceita no processo seletivo do programa de pós graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) no Brasil, na área de Produção Animal, realizando atividades de pesquisa em criopreservação de tecido testicular para preservação espermatogônias e os testes de validação para a conservação de espécies junto com o grupo AQUAM (Produção e conservação das espécies aquáticas) sob a orientação do professor Danilo Pedro Streit Jr.