

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Ação Antioxidante da Melatonina na Criopreservação de Tecido Ovariano, Sêmen e
Embriões de Zebrafish (*Danio rerio*)**

Autora: Larise Caroline Oliveira Lima

PORTO ALEGRE

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Ação Antioxidante da Melatonina na Criopreservação de Tecido Ovariano, Sêmen e Embriões de Zebrafish

Autora: Larise Caroline Oliveira Lima

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Biotécnicas da Reprodução em Peixes.

Orientador: Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Jr

PORTO ALEGRE

2024

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

CIP - Catalogação na Publicação

Lima, Larise Caroline Oliveira
Ação Antioxidante da Melatonina na Criopreservação
de Tecido Ovariano, Sêmen e Embriões de Zebrafish /
Larise Caroline Oliveira Lima. -- 2024.
64 f.
Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

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


1. Criopreservação de gametas. 2. Resfriamento de
embriões. 3. Estresse oxidativo. 4. Peroxidação
lipídica. 5. Zebrafish. I. Streit Jr, Danilo Pedro,
orient. II. Título.

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

Larise Caroline Oliveira Lima


Ação Antioxidante da Melatonina na Criopreservação de Tecido Ovariano, Sêmen e Embriões de Zebrafish (*Danio rerio*)

AVALIADO POR:

Documento assinado digitalmente
 **DANILO PEDRO STREIT JR**
Data: 05/12/2024 08:29:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr. Danilo Pedro Streit Jr – FAVET/UFRGS

Orientador e Presidente da Comissão

Documento assinado digitalmente
 **FRANCIELLI WEBER SANTOS CIBIN**
Data: 03/12/2024 13:34:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr (a) Francielli Weber Santos Cibir – UNIPAMPA (Campus Uruguaiana)

Membro da Comissão

Documento assinado digitalmente
 **DANIELE MISSIO**
Data: 03/12/2024 16:29:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr (a) Daniele Missio – UFSM (Campus Palmeira das Missões)

Membro da Comissão

Documento assinado digitalmente
 **ROMULO BATISTA RODRIGUES**
Data: 04/12/2024 07:33:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr Rômulo Batista Rodrigues – UFSM (Campus Palmeira das Missões)

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Chegou o momento de agradecer as pessoas que sempre se fizeram presente em minha vida. Agradeço a minha família, ao meu pai Walkirio Franco de Lima, minha mãe Maria Amélia Cabral de Oliveira Franco e minha irmã Geisianne de Oliveira Lima, muito obrigada pelo apoio. A distância nos mostrou o quanto os laços familiares são importantes na nossa vida, mesmos distantes, vocês me apoiaram e se fizeram presentes em minha vida. Minha eterna gratidão, vocês são o meu bem mais precioso. Eu amo vocês.

Ah minhas estrelinhas...obrigada aos meus avôs Jerônimo Ramos de Oliveira e Antônio Venceslau de Lima, e avó Luzia Alves Cabral, que plantaram a sementinha da sede do conhecimento em mim lá atrás. Minha vizinha, obrigada pelos ensinamentos que trago para a vida, você foi e sempre será o maior amor da minha vida.

Eu não poderia esquecer de agradecer ao meu tio Luziano Cabral de Oliveira, pelo apoio quando decidi me mudar para Porto Alegre, mesmo não gostando da ideia, me apoiou em minha decisão. Você foi o segundo pai que a vida me deu, e lamento muito não conviver tão próxima a você nos últimos dois anos, a distância às vezes castiga. Você agora é uma estrelinha que ilumina os meus dias, e sempre estará vivo dentro de mim, eu amo você.

Agradeço a dona Nubia Sandra Martins Figueira da Silva, minha família gaúcha, a senhora é luz por onde passa. Gratidão por tudo, pelos conselhos e ensinamentos, pelas horas de conversa, pelo carinho, pelos mimos, pelos bolos e cafezinhos quando eu estava cansada de estudar. A senhora vai estar presente em minha vida, obrigada por tudo.

Agradeço ao meu orientador Dr Danilo Pedro Streit Jr, por todo apoio durante esses dois anos. Mesmo distante, sempre tentou me auxiliar como pôde. Gratidão professor.

Ao professor Dr Marcelo Bertolini, minha eterna gratidão por todo apoio. O senhor e sua equipe foram luz em minha vida, minha eterna gratidão. Obrigada por abrir as portas do seu laboratório, por todo conhecimento compartilhado, as horas incansáveis de conversa tentando me auxiliar, mesmo não tendo experiência com o modelo animal ao qual eu trabalho, suas contribuições foram louváveis.

Obrigada aos colegas do laboratório de embriologia, Giovanni Copello, Verônica Benvenuti, Louise Köhler e Eduardo Sanguinet. Vocês tornaram meus dias de experimento mais suaves. Obrigada pelo carinho e apoio, sempre lembrarei de vocês com imenso carinho.

Não poderia deixar de agradecer a todos os colegas e amigos da equipe do laboratório AQUAM, principalmente a Lis Santos Marques e ao Rômulo Rodrigues Batista, por todo apoio. Nada seria possível sem a colaboração de todos vocês.

Agradeço aos mais que colegas de trabalho, aos amigos Eduardo Thomé Nicoleti, Raquel Santos dos Santos, Renata Villar Dantas e Tales Fabris Chaves, por toda parceria e amizade. Vocês me apoiaram durante toda minha trajetória. Eduardo, eu nunca me esquecerei do apoio no momento que mais precisei, você estava firme, você é luz nunca duvide disso.

E o mais importante e “muito menos clichê”, obrigada a Deus, ele é bem vivo dentro do meu coração e sabe da minha sinceridade e o quanto dei o meu melhor durante meu trajeto.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do potencial antioxidante da metoxi-N-acetiltriptamina ou também conhecida por melatonina, em sêmen e fragmentos de tecido ovariano de zebrafish criopreservados, e em embriões resfriados de zebrafish. O sêmen de zebrafish foi criopreservado, com diferentes concentrações de melatonina 0 M, 10^{-11} M, 10^{-9} M e 10^{-7} M, e posteriormente foram realizados testes bioquímicos nesses tecidos criopreservados. O tecido ovariano foi criopreservado com diferentes concentrações de melatonina 0 M, 10^{-11} M, 10^{-9} M e 10^{-7} M, e posteriormente foram realizados testes bioquímicos nesses tecidos criopreservados. Também foi avaliado a influência das concentrações de 0 M, 10^{-11} M, 10^{-9} M e 10^{-7} M de melatonina, sobre a taxa de sobrevivência e taxa de eclosão em embriões resfriados de zebrafish. Para o sêmen foram realizados os testes de análises bioquímicas: quantificação proteica, peroxidação lipídica, avaliação da atividade enzimática Superóxido Dismutase (SOD), avaliação da atividade da enzima Catalase (CAT), avaliação da atividade da glutationa S-transferase (GST), além do teste de Ensaio de Cometa. Para o tecido ovariano foram realizados o teste de integridade de membrana, e os testes para estresse oxidativo: ensaio de diacetato de Diclorodihidrofluoresceína DCHF-DA, o potencial antioxidante redutor férrico e o teste de TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico). Os embriões foram resfriados e avaliados taxa de sobrevivência e eclosão. Neste estudo a melatonina demonstrou resultados positivos como antioxidante para o sêmen criopreservado de zebrafish nas concentrações de 10^{-11} e 10^{-9} , reduzindo danos de EROs e danos ao DNA. Porém, para o tecido ovariano e embriões de zebrafish não houve efeito antioxidante significativo.

Palavras-chave: Criopreservação, crioinjúria, EROs, resfriamento, biotecnologias da reprodução.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the influence of the antioxidant potential of methoxy-N-acetyltryptamine, also known as melatonin, on cryopreserved zebrafish semen and ovarian tissue fragments, as well as on cooled zebrafish embryos. Zebrafish semen was cryopreserved with different concentrations of melatonin (0 M, 10^{-11} M, 10^{-9} M, and 10^{-7} M), and biochemical tests were subsequently performed on these cryopreserved tissues. Ovarian tissue was cryopreserved with different concentrations of melatonin (0 M, 10^{-11} M, 10^{-9} M, and 10^{-7} M), and biochemical tests were also performed on these cryopreserved tissues. The influence of melatonin concentrations of 0 M, 10^{-11} M, 10^{-9} M, and 10^{-7} M on the survival and hatching rates of cooled zebrafish embryos was also evaluated. For semen, the following biochemical tests were conducted: protein quantification, lipid peroxidation, evaluation of Superoxide Dismutase (SOD) enzyme activity, evaluation of Catalase (CAT) enzyme activity, evaluation of Glutathione S-transferase (GST) activity, as well as the Comet Assay. For ovarian tissue, the membrane integrity test and tests for oxidative stress were conducted: diacetate of Dichlorodihydrofluorescein (DCHF-DA) assay, ferric reducing antioxidant potential, and the TBARS (thiobarbituric acid-reactive species) test. The embryos were cooled, and survival and hatching rates were evaluated. In this study, melatonin showed positive results as an antioxidant for cryopreserved zebrafish semen at concentrations of 10^{-11} M and 10^{-9} M, reducing ROS damage and DNA damage. However, no significant antioxidant effect was observed for zebrafish ovarian tissue and embryos.

Keywords: Cryopreservation, cryoinjury, ROS, cooling, reproductive biotechnologies.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

EROs	Espécies reativas a oxigênio
O ₂ -	Ânion superóxido
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
NO	Óxido nítrico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CRISPR/cas9	Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas
ZIRC	Centro internacional de recursos zebrafish
FIV	Fertilização in vitro
CLC	Metil-β-ciclodextrina carregado de colesterol
MβC	Metil-β-ciclodextrina descarregado de colesterol
mg	Miligramas
%	Porcento
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
mm	Milímetros
M	Molar
Me ₂ SO	Sulfato de dimetila
VS	Sem encapsulamento
VS1 - UM	Encapsulamento com crioprotetor
VS2 - A	Encapsulado com a metade de crioprotetor
VA	Encapsulado sem crioprotetor
°C	Graus Celsius
g/mol	Gramas por mol
MT1	Proteína MT1 receptora de melatonina
MT2	Proteína Mt2 receptora de melatonina
h	Horas

hpf	Horas pós fertilização
TBARS	Teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
DCF	Diclorofluoresceína
FRAP	Potencial antioxidante redutor férrico
SOD	Enzima Superóxido dismutase
GST	Enzima Glutathione S-transferase
•OH	Radical hidroxila
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação em Animais de Laboratório
L	Litros
cm	Centímetros
®	Símbolo de marca registrada
mg/mL	Miligramas por microlitros
pH	Potencial hidrogeniônico
µl	Microlitros
NaCl	Cloreto de sódio
KCl	Cloreto de potássio
g	Gramas
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Cloreto de cálcio dihidratado
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
osm/kg	Osmolaridade por kilogramas
nm	Nanômetros
TBA	Molécula de ácido tiobarbitúrico
TCA	Molécula de ácido tricloroacético
nmol	Unidade de medida que equivale a 10 ⁻⁹ de um mol
MDA	Malondialdeído
U	Uma unidade
CAT	Enzima Catalase
µmol	Micromol
CDNB	1-Chloro-2,4-dinitrobenzene

min	Minutos
NMP	Ponto de fusão normal
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
mM	Porcentagem massa-massa
TRIS	Tris (hidroximetil)
NaOH	Hidróxido de sódio
V/cm	Volt por centímetros
mA	Milimpère
L-15	Meio para cultivo Leibovitz
SE	Solução de equilíbrio
SV	Solução de vitrificação
±	Mais ou menos
Tris-HCl	Cloridrato de tris (hidroximetil) aminometano
p/v	Peso/volume
DCHF-DA	Diacetato de diclorodi-hidrofluoresceína
Fe+3	Ferro (III)
Fe+2	Ferro (II)
TPTZ	Ferro reagente
ηMol	Equivale a 10 ⁻³ ηMol
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
=	Igual
<	Menor
O ₂	Oxigênio
H ₂ O	Água
ROOH	Peróxidos lipídicos
ROO	Peróxila
OXPHOS	Fosforilação oxidativa

VAP	Velocidade média da trajetória
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade em linha reta
MT3	Proteína MT3 receptora de melatonina
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa
G-	Radical guanosina
OTM	Olive Tail Moment
V2 (V2E)	Crioprotetor externo
Nrf2	Fator nuclear eritróide 2
HO-1	Heme oxigenase 1
GSTM1	Glutationa S-transferase Mu1
Ca ⁺²	Cálcio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Criopreservação de Gametas em Peixes.....	14
2.2 Resfriamento de Embriões.....	17
2.3 Eros.....	18
2.4 Enzimas Antioxidantes.....	19
2.5 Uso de Antioxidantes nas Soluções Crioprotetoras.....	19
2.6 Melatonina.....	21
2.7 Zebrafish.....	23
3. OBJETIVOS.....	24
3.2 Objetivos Específicos.....	24
4. CONCLUSÕES.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
ANEXO A Carta de aprovação/adendo.....	39

1. INTRODUÇÃO

Apesar da criopreservação de espermatozoides de diversas espécies de peixes ser possível (Rahman *et al.*, 2013), com protocolos comprovadamente eficientes, ainda não foi possível criopreservar oócitos maduros de peixes com sucesso. Crioinjúrias severas têm sido relatadas, em estudos realizados com criopreservação de oócitos de zebrafish, em estágios avançados de maturação (Isayeva *et al.*, 2004; Guan *et al.*, 2008, Zampolla *et al.*, 2008).

Durante processos de criopreservação, a exposição abrupta da célula ao choque frio juntamente com as variações do oxigênio atmosférico, causam uma elevada produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO) (Figuerola *et al.*, 2019; Torres *et al.*, 2024). Dessa forma, a utilização de antioxidantes associados a meios crioprotetores se tornam alternativas, por conseguirem amenizar os efeitos do estresse oxidativo em células expostas a processos de congelamento e descongelamento (Sanddoyal-Vargas *et al.*, 2020; Félix *et al.*, 2023).

Ou seja, o desenvolvimento de novos protocolos e os aprimoramentos de protocolos existentes com criopreservação de gametas de peixes, utilizando antioxidantes, podem melhorar os resultados com a criopreservação de espermatozoides e viabilizar a criopreservação de oócitos maduros e embriões (Félix *et al.*, 2023).

Alternativas como a melatonina que é uma molécula indolamina anfifílica, pode regular diretamente alguns processos bioquímicos intracelulares e consegue realizar a eliminação direta de radicais livres e produtos de radicais livres, ou seja, o efeito antioxidante da melatonina depende da interação direta com espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e ainda pode aumentar a expressão antioxidante mediante receptores (Baltatu *et al.*, 2019).

Já é sabido que a melatonina endógena em peixes tem função protetora no organismo (Félix *et al.*, 2023), porém durante o processo natural de maturação dos espermatozoides por exemplo, ocorre uma perda significativa de substâncias antioxidantes presentes no citoplasma (Carvalho *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2024). E mais, diluições de soluções para criopreservação, diminuem as concentrações de antioxidantes presentes no líquido seminal, tornando as células consideravelmente mais suscetíveis à ação das EROs (Cabrita *et al.*, 2011; Martínez-Páramo *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2024).

Diante do exposto, este estudo dedicou-se em avaliar o potencial antioxidante da melatonina na criopreservação de sêmen e fragmentos de tecido ovariano de zebrafish.

Também avaliamos o resfriamento de embriões de zebrafish com melatonina, como uma alternativa. Assim, essa pesquisa analisa a eficiência da melatonina como suplementação antioxidante de criosoluções.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Criopreservação de Gametas em Peixes

A criopreservação é um conjunto de técnicas como o resfriamento, congelamento lento e vitrificação, que preservam a viabilidade das células ou dos tecidos armazenados em baixas temperaturas, em estado de quiescência, induzindo à parada das reações enzimáticas, possibilitando, após o aquecimento do sistema, a restauração da atividade metabólica. (Santos *et al.*, 2010; Torres *et al.*, 2024).

Essas biotecnologias permitem a estocagem de DNA de animais de alto valor zootécnico, transgênicos ou espécies ameaçadas de extinção (Santos *et al.*, 2010), além de também ser empregada para preservação de células-tronco destinadas à medicina regenerativa (He *et al.*, 2008).

Dessa forma, o fato de a aquicultura ser uma atividade de extrema importância para a produção de alimento e, para a preservação de espécies aquáticas, justifica-se a criação e manutenção de bancos genéticos ou criobancos para a conservação de gametas e preservação de recurso genéticos de peixes (Marques *et al.*, 2018).

Alguns estudos relatam que, a criopreservação de espermatozoides em peixes já ocorre a mais de 50 anos, e desde então estima-se que protocolos de criopreservação de espermatozoides já foram desenvolvidos em mais de 200 espécies de peixes (Tiersch *et al.*, 2000).

A criopreservação de sêmen de variadas espécies como salmonídeos, ciprinídeos, ciclídeos, silurídeos, acipenserídeos, anastomídeos e caracídeos já foi relatada (Suquet *et al.*, 2000; Carolsfeld *et al.*, 2003; Streit Jr *et al.*, 2008; Viveiros & Godinho, 2009; Yildiz *et al.*, 2013; Palhares *et al.*, 2021), e o sêmen criopreservado já é utilizado para a reprodução de muitas espécies selvagens e de criação (Fornari *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2013).

Além da criopreservação de sêmen das espécies de peixes citadas, há relatos da criopreservação de sêmen de zebrafish desde o início da década de 1980 (Harvey *et al.*, 1982). Essa espécie, é extremamente estudada em pesquisas biomédicas (Grunwald *et al.*, 2002), e a segurança da preservação de material genético é de extrema importância, ao evitar transtornos

como perda acidental de plantéis com linhagens geneticamente modificadas por CRISPR/cas9 (Martínez-Páramo *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2022).

O Centro Internacional de Recursos Zebrafish (ZIRC), é um instituto de pesquisa, onde são armazenadas variadas linhagens de zebrafish, através de células espermáticas, desde linhagens selvagens até a das mutantes e transgênicas. Quando solicitado por outros laboratórios, o ZIRC fornece células e animais, os pesquisadores descongelam as células espermáticas e fertilizam óvulos por meio de FIV (fertilização in vitro) (Matthews *et al.*, 2024).

Recentemente em um estudo realizado por Matthews *et al.* (2024), foram testados em criopreservação de sêmen de zebrafish, metil- β -ciclodextrina (CLC) carregado de colesterol e metil- β -ciclodextrina descarregado de colesterol (M β C). Basicamente, os espermatozoides foram expostos a essas substâncias antes do processo de criopreservação e após descongelamento foram avaliadas motilidade e fertilização mediante a FIV. Esse estudo demonstrou que, o colesterol na concentração entre 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 mg de CLC por $1,2 \times 10^8$ células conseguiu aumentar a motilidade espermática após descongelamento, além de mostrar que o sêmen tratado com colesterol foi superior ao sêmen não tratado, aumentando a taxa de fertilização in vitro em 15% quando comparado ao grupo não tratado com colesterol. Os autores também relataram que o sêmen tratado com colesterol apresentou aumento de motilidade após o descongelamento, e sugerem que a adição de colesterol ao diluente antes da criopreservação do sêmen de zebrafish é benéfico para as células descongeladas, melhorando a quantidade e qualidade seminal.

Contudo, a criopreservação de espermatozoides preserva o genoma paterno, não sendo suficiente para a preservação da diversidade genética, que depende também do genoma de origem materna (Zhang *et al.*, 2007; Freitas *et al.*, 2023). A criopreservação do genoma materno também é essencial, visto que o DNA mitocondrial e o mRNA são heranças repassadas por fêmeas, os quais determinam os estádios iniciais de desenvolvimento embrionário (Guan *et al.*, 2008).

Algumas características dos oócitos e embriões de peixes se tornam indesejáveis para o sucesso da criopreservação, o tamanho grande comparado a outras espécies animais, o alto teor lipídico intracitoplasmático e a impermeabilidade da membrana dificultam que agentes crioprotetores penetrem nessas células (Mazur *et al.*, 2008; Marques *et al.*, 2019).

De acordo com Tsai *et al.* (2009a), a criopreservação de folículos ovarianos pode oferecer vantagens em relação aos embriões de peixes devido à ausência de um córion completamente formado. Outro aspecto seria de o fato de os folículos ovarianos em estágio

inicial apresentarem um menor tamanho, resultando em uma maior relação superfície/volume e, podendo influenciar na permeabilidade de água e solutos, o que elevaria as chances de sobrevivência durante o processo de criopreservação.

Alguns trabalhos investigaram a eficiência da vitrificação na criopreservação de folículos ovarianos em peixes (Guan *et al.*, 2010; Godoy *et al.*, 2013), os quais relataram alta perda da viabilidade folicular após o processo de aquecimento. No entanto, ambos os estudos utilizaram folículos em estágio III (vitelogênico).

Foi observado em trabalhos do nosso grupo, elevado percentual de viabilidade de folículos imaturos (76% nos estádios I e 43% nos estádios II), após vitrificação, validada mediante análises com sondas fluorescentes de iodeto de propídio e diacetato de fluoresceína (Marques *et al.*, 2014). Evidenciou-se que, folículos imaturos de peixes apresentam maiores chances de sobrevivência após a vitrificação, em comparação aos folículos em estádios mais avançados de maturação (III, IV e V), tornando um desafio a ser elucidado.

No primeiro estudo com criopreservação de tecido ovariano de zebrafish, foi sugerido que folículos ovarianos em estágios iniciais (I e II) sofreram menos agressões criogênicas quando comparados aos folículos em estágio vitelogênico (III), pois os folículos imaturos apresentam dimensões menores, facilita a permeabilidade dos crioprotetores, aumentando as chances de sucesso durante o processo de criopreservação (Zanola *et al.*, 2011).

Para a criopreservação de tecido ovariano, é indicado utilizar fragmentos pequenos de dimensões menores ou igual a 2 mm (Ferreira *et al.*, 2010). Tecidos mais espessos podem acarretar uma inadequada penetração do agente crioprotetor, impedindo a completa proteção contra os danos causados pelo procedimento de criopreservação. Já foi observado por Ferreira *et al.* (2010) uma ocorrência de alterações morfológicas maiores ao congelar o tecido ovariano bovino, em dimensão superior a 2 mm.

Em um estudo realizado por Freitas *et al.* (2023), fragmentos de tecido ovariano de zebrafish foram criopreservados em criotubo (1,5 M de metanol + 5,5 M Me₂SO + 0,5 M de Sacarose), utilizando a técnica de encapsulamento de hidrogel de alginato de sódio, com diferentes tratamentos (VS-sem encapsulamento, VS1 – UM – encapsulado com crioprotetor, VS2 – A – encapsulado com metade da concentração de crioprotetor, VA – encapsulado sem crioprotetor. Neste estudo, os autores demonstraram que a técnica de encapsulamento em hidrogel de alginato de sódio não apresentou ação crioprotetora para os fragmentos de tecido

ovariano, porém, a integridade da membrana dos folículos ovarianos permaneceu íntegra quando a técnica foi associada ao tratamento (VS1 – UM).

Através da criopreservação de embriões, por exemplo, é possível preservar por longos prazos os materiais genéticos maternos e paternos, o que pode fornecer material genético para pesquisas científicas em aquicultura (Tian *et al.*, 2017). Porém, apesar de possível, ainda é dispendioso a criopreservação de embriões de peixes (Tian *et al.*, 2017). Alguns estudos avaliaram a efetividade em congelar embriões de algumas espécies de peixes, porém encontraram algumas dificuldades como: complexa estrutura, o grande tamanho, grande conteúdo lipídico, baixa permeabilidade da membrana e alta sensibilidade ao resfriamento (Marques *et al.*, 2021).

2.2. Resfriamento de Embriões

Apesar de Blaxter conseguir realizar a criopreservação de gametas de peixes desde meados de 1950 (Blaxter, 1953), ainda é um desafio a criopreservação bem-sucedida de embriões de peixe (Tian *et al.*, 2017).

Quando comparados com embriões de mamíferos, os embriões de peixes possuem estruturas mais complexas, com maior quantidade de água e vitelo, e múltiplas camadas sinciciais circundando os embriões em desenvolvimento e o vitelo (Tian *et al.*, 2017). Ou seja, processos de criopreservação viáveis de embriões de peixes ainda é um desafio (Tian *et al.*, 2017).

Dessa forma, o uso de biotecnologias como o resfriamento de embriões surge como alternativa. Basicamente o resfriamento mantém os ovos em temperaturas baixas, mas ainda acima do ponto de congelamento, reduzindo a atividade metabólica das células e postergando a viabilidade desse material genético em ambiente externo, porém, ainda por períodos limitados (Paes, 2013; Paula *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2019).

Através do resfriamento de embriões por exemplo, é possível realizar o transporte de material genético de locais remotos para laboratórios de pesquisa (Ahammad *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2019), ou até mesmo, transportar desovas de peixes que podem ser aproveitadas sob ameaças de poluentes (Miliorini *et al.*, 2002; Fornari *et al.*, 2012; Paes *et al.*, 2017). Ou seja, a curto prazo, o resfriamento de embriões apresenta ser uma opção viável. Porém, apesar de aparente simplicidade, o sucesso nos resultados com essa técnica dependerá da espécie e uso de crioprotetores específicos (Machado *et al.*, 2019). Um estudo realizado por

Streit-Jr *et al.* (2007), demonstrou que as soluções de resfriamento que continham metanol e sacarose, apresentou as melhores taxas de eclosão, com resfriamento durante seis horas na temperatura de -8°C , em embriões de *Piaractus mesopotamicus*.

Ou seja, via um protocolo de resfriamento adequado para a espécie, é possível manter a viabilidade dos embriões resfriados até que seja possível transportar material genético entre locais remotos (Streit Júnior *et al.*, 2007).

2.3 EROs

Para ocorrer um equilíbrio da homeostase de todos os sistemas biológicos, é necessário um equilíbrio redox orquestrando as reações oxidativas e redutoras, para não ocorrer um acúmulo de moléculas oxidantes, sendo a perda da capacidade de redução celular (Gaschler & Stockwell, 2017). Todos os sistemas biológicos que possuem metabolismo celular aeróbico, produzem EROs durante o processo de redução, onde o oxigênio (O_2) sofre redução tetravalente, aceitando quatro elétrons e resultando em água (H_2O) (Souza & Morais, 2016).

Alguns estudos trazem que os radicais livres podem contribuir com alguns processos de sinalização celular, conhecidos como sinalização redox, e quando em pequenas concentrações as espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser positivas durante a regulação de processos como a manutenção da homeostase (Finkel & Holbrook, 2000; Sharif-Rad *et al.*, 2020). Porém, a produção excessiva de EROs pode modificar a estrutura de proteínas celulares alterando suas funções, e conseqüentemente levar à disfunção celular com interrupção de processos celulares vitais (Finkel & Holbrook, 2000; Sharif-Rad *et al.*, 2020).

Quando os níveis de EROs estão altos, podem ocorrer danos a proteínas e DNA das células, e principalmente, as EROs podem levar ao rompimento da membrana lipídica e aumentar conseqüentemente a fluidez e permeabilidade das membranas. Quanto aos danos em proteínas, as EROs podem modificar aminoácidos específicos, levando a fragmentação da cadeia peptídica, alterar a carga elétrica da membrana, causar inativação enzimática e conseqüentemente levar à proteólise (Finkel & Holbrook, 2000; Sharif-Rad *et al.*, 2020).

Além da formação de EROs como o superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) oriundos dos processos de oxidação celular, também ocorre a formação de peróxidos lipídicos (ROOH) ou radicais hidroxila (OH) e peroxila (ROO) (Gaschler & Stockwell, 2017).

A membrana dos espermatozoides, por exemplo, pode sofrer estresse oxidativo adicional, pois o plasma seminal apresenta um complexo sistema redox antioxidante contendo um potencial oxidativo de metabólitos espermáticos, que regulam a lipoperoxidação espermática (Stradaioli *et al.*, 2007; Souza & Morais, 2016). Este contexto traz a hipótese que a membrana espermática pode sofrer estresse oxidativo adicional (Taylor, 2001; Souza & Morais, 2016).

2.4 Enzimas Antioxidantes

As enzimas antioxidantes são definidas entre antioxidantes primários ou secundários, ou antioxidantes de múltiplas funções, que apresentam funções primárias e secundárias (Jacobsen, 2019; Félix *et al.*, 2021).

As enzimas primárias combatem a oxidação lipídica, estabilizando os radicais livres por reações diretas, as três enzimas primárias principais são a SOD que catalisa superóxidos em peróxido de hidrogênio e oxigênio, a GPx que tem a mesma função e a CAT que participa da via anterior degradando peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Hermund, 2018; Félix *et al.*, 2021).

Já as enzimas secundárias agem indiretamente na oxidação lipídica e podem ter efeito sinérgico regenerando antioxidantes primários, a glutathione redutase, por exemplo, é responsável pela regeneração do GSH, outros exemplos de enzimas secundárias são a glicose-6-fosfato desidrogenase e a glutathione-s-transferase (Figeroa *et al.*, 2018; Hermund, 2018; Félix *et al.*, 2021).

2.5 Uso de Antioxidantes nas Soluções Crioprotetoras

Os lipídeos são um dos principais integrantes para manter a integridade das membranas celulares e, quando lhes ocorre uma extensa peroxidação, toda a organização, montagem, composição e estrutura das membranas lipídicas é alterada (Gaschler & Stockwell, 2017). Os compostos advindos da peroxidação lipídica, também são capazes de se tornarem compostos reativos que consigam reticular DNA e proteínas (Gaschler & Stockwell, 2017).

Por apresentarem alto teor de ácidos graxos poli-insaturados, os espermatozoides possuem membranas extremamente suscetíveis a danos oxidativos, levando inclusive a

infertilidade (Taylor, 2001). Devido as essas características, os espermatozoides de peixes se tornam alvo perfeito para injúrias causadas pelas EROs, podendo sofrer peroxidação lipídica e proteica, danos na peça intermediária e no axonema, fragmentação do DNA e comprometimento mitocondrial (Cabrita *et al.*, 2014; Félix *et al.*, 2021).

Os espermatozoides são células que demandam muita energia para desempenhar sua função, essa energia advém por duas vias metabólicas principais, através da glicólise que ocorre na parte principal do flagelo e através da fosforilação oxidativa (OXPHOS) que ocorre nas mitocôndrias localizadas na parte intermediária do flagelo (Du Plessis *et al.*, 2015; Martín-Hidalgo *et al.*, 2019).

Os espermatozoides são poupados das EROs com antioxidantes naturais presentes do plasma seminal, e a diluição desses antioxidantes na crio solução revisita a necessidade do uso de compostos antioxidantes como complemento dessas crio soluções, na tentativa de amenizar o estresse oxidativo (Cabrita *et al.*, 2011; Martínez-Páramo *et al.*, 2012; Sandoval-Vargas *et al.*, 2021; Torres *et al.*, 2024). As altas concentrações de EROs encontradas em amostras de sêmen, podem estar associadas com o declínio do metabolismo de energia do espermatozoide, na motilidade e na viabilidade espermática e fragmentação do DNA (Baumber *et al.*, 2002; Bilodeau *et al.*, 2002 Souza & Morais, 2016).

Durante processos de criopreservação, a exposição abrupta da célula ao choque frio juntamente com as variações do oxigênio atmosférico, causam uma elevada produção de EROs, como o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO) (Figueroa *et al.*, 2019; Torres *et al.*, 2024).

Diante do exposto, os pesquisadores estão em busca de alternativas para amenizar esses efeitos (Cabrita *et al.*, 2010; Figueroa *et al.*, 2019; Félix *et al.*, 2023). A criação de novos protocolos de criopreservação, tendem tentar neutralizar os danos causados em células expostas a processos de criogenia como, deficiências de membrana, fragmentação de DNA, alterações no potencial de membrana mitocondrial, perda de motilidade e viabilidade de espermatozoides dentre outros (Cabrita *et al.*, 2010; Figueroa *et al.*, 2019; Félix *et al.*, 2023).

Dessa forma, alternativas como antioxidantes associados a meios crioprotetores se tornam viáveis, por conseguirem amenizar os efeitos do estresse oxidativo em células expostas a processos de congelamento e descongelamento (Sandoval-Vargas *et al.*, 2020; Félix *et al.*, 2023).

Apesar dos benefícios explanados sobre o uso de antioxidantes em crio soluções, a suplementação dessas substâncias em estudos com congelamento de sêmen de peixe pode ser melhor explorada (Osipova *et al.*, 2016; Félix *et al.*, 2023), assim como em outros tipos de células criopreservadas.

2.6 Melatonina

A 5 metoxi-N-acetilriptamina ou também conhecida por melatonina, foi descrita bioquimicamente em 1959 (Lerner *et al.*, 1959; Cipolla-Neto *et al.*, 2019). Essa substância é derivada do triptofano (massa molecular de 232,3 g/mol) e apresenta propriedades antioxidantes mediante estímulos em enzimas antioxidantes de diferentes tecidos (Cipolla-Neto *et al.*, 2019).

A molécula de melatonina é produzida principalmente pela glândula pineal, mas também pode em outras regiões do organismo como a retina, células da medula óssea, plaquetas, pele e linfócitos (Tordjman *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2024), atuando com funções autócrinas e parácrinas (Cipolla-Neto *et al.*, 2019). A melatonina é um hormônio que consegue sincronizar osciladores centrais e periféricos no pâncreas, fígado, rim, glândula adrenal fetal, coração, pulmão, intestino, mantendo a organização temporal das funções biológicas (Tordjman *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2024). A melatonina circulante no organismo é sintetizada na glândula pineal, e a sua síntese está sob o controle do sistema nervoso simpático, sendo coordenada pelo ciclo circadiano, o qual se inicia no núcleo supraquiasmático hipotalâmico (Cipolla-Neto *et al.*, 2019; Baltatu *et al.*, 2019), através das células ganglionares fotossensíveis intrínsecas da retina (Cipolla-Neto *et al.*, 2019). A secreção de melatonina depende de um ritmo circadiano sincronizado, claro-escuro (dia e noite), e sua síntese ocorre durante a fase escura em mamíferos (Baltatu *et al.*, 2019).

Esse hormônio atua direta ou indiretamente regulando vários processos fisiológicos como sono e vigília, temperatura corporal, secreção hormonal e reprodução (Carlomagno *et al.*, 2018; Lia *et al.*, 2024). A molécula de melatonina pode agir via mecanismos de ação dependentes de receptor (MT1 e MT2), ou por mecanismos não dependentes de receptores como proteínas de ligação intracelular e efeitos antioxidantes (Baltatu *et al.*, 2019).

Os receptores MT1 e MT2 são encontrados em neurônios hipotalâmicos que regulam os processos de liberação de gonadotrofinas hipofisárias, estudos ressaltam que os receptores MT1 e MT2 estão presentes em tecidos reprodutivos humanos como as células da granulosa

ovariana, células lúteas, miométrio uterino, os quais podem influenciar a funcionalidade destas células (Woo *et al.*, 2001; Schlabritz-Loutsevitch *et al.*, 2003; Dubocovich & Markowska, 2005; Li *et al.*, 2024). Também já foram identificados receptores de melatonina no tecido cardíaco, e este hormônio pode interferir na pressão arterial e frequência cardíaca (Baltatu *et al.*, 2017; Baltatu *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2024).

Além dos vários mecanismos de ação anteriormente citados, a melatonina também pode operar como um potente eliminador de radicais livres (Baltatu *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2024) e pode agir modulando processos inflamatórios e resposta imune (Carrillo-Vico A *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2024).

Demonstrando os efeitos da melatonina, na motilidade de espermatozoides de peixes após a criopreservação, Torres *et al.* (2024), testaram três diferentes antioxidantes: a taurina, cisteína e a melatonina, na solução crioprotetora para o congelamento de espermatozoides de *Prochilodus brevis*. Foram utilizadas as concentrações de 0,6, 1,12, 2,0 e 3,56 mM de melatonina. Após o descongelamento, a solução crioprotetora contendo a concentração de 3,56 mM e 2 mM de melatonina, se apresentaram mais eficientes quanto a velocidade espermática, na velocidade média de trajetória (VAP) e velocidade curvilínea (VCL). Porém, a melatonina a 3,56 mM foi a que apresentou melhor resultado nos parâmetros cinéticos (motilidade rápida, VCL, VSL (velocidade em linha reta) e VAP).

O uso de melatonina em soluções crioprotetoras para criopreservação de embriões em outras espécies animais demonstrou ser extremamente eficiente (Castro *et al.*, 2022), como exemplos dessas espécies podemos citar bovinos (Zhao *et al.*, 2015), suínos (Shi *et al.*, 2009), ovelha (Succu *et al.*, 2011) e humanos (Espino *et al.*, 2010; Ortiz *et al.*, 2011).

Recentemente, Zhang *et al.* (2024), realizaram um estudo com criopreservação de oócitos de humanos, suplementados com melatonina na concentração de 10^{-9} M e um grupo controle 0 M de melatonina. A seguir descongelaram essas células e cultivaram por 2,5h em um meio de maturação, seguido por fertilização, e transferência de embrião. Esse grupo demonstrou que as taxas de sobrevivência, clivagem, embrião com alta qualidade, gravidez clínica e gravidez em andamento foram consideravelmente melhores no grupo suplementado com melatonina a 10^{-9} M (62,40% *versus* 51,87%). Com esses resultados positivos, este estudo sugeriu que a melatonina pode melhorar o desenvolvimento de oócitos humanos vitrificados, refletindo na melhora da qualidade embrionária, e principalmente, ela pode contribuir efetivamente para a obtenção de melhores resultados clínicos.

Diante do exposto, a melatonina surge como alternativa antioxidante de proteção aos espermatozoides, dos danos causados pela oxidação quando essas células são expostas a processos de criopreservação (Souza & Morais, 2016).

2.7 Zebrafish

O zebrafish (*Danio rerio*) é um peixe bem descrito na literatura, possui genoma sequenciado e homologia com o DNA humano (Kimmel, 1995; Horzmann & Freeman, 2018). Em algum momento da evolução mamíferos e teleósteos se divergiram de um ancestral comum a aproximadamente 340 milhões de anos, apesar dessa contraposição, o DNA do zebrafish é ortólogo ao DNA humano em aproximadamente 82% (Howe *et al.*, 2013).

O primeiro pesquisador a utilizar o zebrafish como modelo experimental foi George Streisinger, na década de 1970 (Baetene & Jong, 2018). Desde então, o zebrafish vem sendo utilizado em estudos visando identificar teratógenos e, descobrir mecanismos de ação de tóxicos (Bambino & Chu, 2017), dentre outras áreas de pesquisa.

As reproduções deste peixe alcançam elevado número de prole (Bambino & Chu, 2017), e os embriões desse animal se desenvolvem externamente, são opticamente translúcidos nas primeiras horas pós-fertilização (hpf) facilitando sua visualização em microscópio óptico, possuem desenvolvimento mais rápido que em mamíferos, e em até 72 hpf já apresentam os principais sistemas do corpo formados (Kimmel, 1995; Horzmann & Freeman, 2018).

Este ciprinídeo possui organismo complexo, apresentando sistemas e órgãos com vias metabólicas semelhantes aos mamíferos, os quais permitem avaliação toxicocinética e toxicodinâmica de xenobióticos (Horzmann & Freeman, 2018). O zebrafish é extremamente eficiente para o estudo de funções imunes inatas, possui translucidez de forma que permita a visualização em tempo real de proteínas fluorescentes a nível celular *in vivo* (Ren *et al.*, 2017).

O sistema imunológico do zebrafish é extremamente semelhante ao dos mamíferos, este sistema começa a se desenvolver com 24 hpf, com macrófagos primitivos seguidos pelos neutrófilos com 32 a 48 hpf, facilitando o estudo das larvas de zebrafish como modelo experimental em estudos imunológicos (Zhou *et al.*, 2020). O estudo de recrutamento de neutrófilos é tão importante que algumas linhas transgênicas de zebrafish como o Tg (coro1a: GFP; lyz: Dsred) foram desenvolvidas especificamente para estudos imunológicos (Zhou *et al.*, 2020).

Com apenas 72 hpf as larvas de zebrafish possuem estruturas semelhantes aos animais vertebrados como, notocorda, arcos faríngeos, conto posterior, somitos, anatomia de

vertebrados comparada a humana e, apesar de não ser mamífero, a espécie apresenta ortólogo de aproximadamente 70% das proteínas comparáveis as humanas (Howe *et al.*, 2013).

Entre 2 e 3 meses o *D. rerio* atinge maturidade sexual, e um casal de reprodutores consegue realizar a produção de centenas de embriões uma vez por semana (Kimmel *et al.*, 1995; Baetene & Jong, 2018). Por apresentarem grande número de descendentes, esse modelo experimental permite a realização de estudos longitudinais em escala populacional, com menor custo quando comparados aos roedores (Lee *et al.*, 2015; Bambino & Chu, 2017).

Por apresentarem genes homólogos aos dos seres humanos, o zebrafish apresenta semelhanças estruturais e funcionais com humanos. Dessa maneira, além de apresentarem excelentes características que justifiquem seu uso em estudos para avaliação de riscos ambientais, também podem ser utilizados para estudos moleculares em humanos (Pyati *et al.*, 2007; Carnevali *et al.*, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação antioxidante de concentrações crescentes de melatonina (0; 10^{-11} ; 10^{-9} ; 10^{-7} M) adicionadas à solução crioprotetora de sêmen, tecido ovariano, e embriões de zebrafish.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito da adição de melatonina nas concentrações de 0, 10^{-11} , 10^{-9} e 10^{-7} M na solução crioprotetora de sêmen de zebrafish, sobre:

- a) O estresse oxidativo nos espermatozoides após a criopreservação, através da análise de peroxidação lipídica pelo teste de TBARS e a atividade de enzimas antioxidantes (Catalase, Superóxido Dismutase e Glutathione S- Transferase);
- b) O dano de DNA nos espermatozoides após a criopreservação, através do Ensaio Cometa;

Avaliar o efeito da adição de melatonina nas concentrações de 0, 10^{-11} , 10^{-9} e 10^{-7} M na solução crioprotetora de tecido ovariano de zebrafish, sobre:

- a) O estresse oxidativo nos oócitos após a criopreservação, através da análise de peroxidação lipídica pelo teste de TBARS e da mensuração do ensaio de diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCF) e do potencial antioxidante redutor férrico (FRAP);
- b) A viabilidade nos oócitos após a criopreservação, através da análise de integridade de membrana;

Avaliar o efeito da adição de melatonina nas concentrações de 0, 10^{-11} , 10^{-9} e 10^{-7} M na solução crioprotetora de embriões de zebrafish, sobre:

- a) A sobrevivência e taxa de eclosão de embriões após o resfriamento.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a melatonina apresentou um potencial antioxidante para sêmen de zebrafish, apesar de não demonstrar os mesmos resultados para oócitos criopreservados e embriões resfriados de zebrafish. Estudos pregressos com mamíferos demonstraram que a adição de melatonina à solução crioprotetora reduziu a produção de EROs e aumentou a capacidade antioxidante de sêmen e tecido ovariano, nos encorajando a testar em zebrafish. As perspectivas deste estudo são de testar diferentes concentrações para os oócitos e embriões de zebrafish criopreservado. A otimização dos protocolos de criopreservação de gametas de zebrafish podem contribuir com a preservação de linhagens cepas da espécie importantíssimas, como modelos biológicos para as mais diversas áreas do conhecimento.

REFERÊNCIAS

1. AEBI, Hugo. [13] Catalase in vitro. In: **Methods in enzymology**. Academic press, 1984. p. 121-126.
2. ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; ZUNIGA, O. The effect of melatonin on the secretion of progesterone in sheep and on the development of ovine embryos in vitro. **Veterinary research communications**, v. 26, p. 151-158, 2002.
3. AHAMMAD, M. M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B. B. Hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos stored at 4 and -2° C in different concentrations of methanol and sucrose. **Theriogenology**, v. 60, n. 8, p. 1409-1422, 2003.
4. ALAM, Md Ariful *et al.* Optimization of protocols for microinjection-based delivery of cryoprotective agents into Japanese whiting *Sillago japonica* embryos. **Cryobiology**, v. 85, p. 25-32, 2018.
5. AMBRUOSI, Barbara *et al.* Cytoplasmic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: implications on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after ICSI. **Theriogenology**, v. 71, n. 7, p. 1093-1104, 2009.

6. ASHRAFI, Iraj; KOHRAM, Hamid; ARDABILI, Farhad Farrokhi. Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 139, n. 1-4, p. 25-30, 2013.
7. AYALA, Antonio *et al.* Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, 2014.
8. BALAMURUGAN, Ramachandran; KARTHIK, Sundaram; ARUL, Venkatesan. Effect of cryopreservation on motility, DNA integrity and gene expression in grey mullet, *Mugil cephalus* sperm. **Cryobiology**, v. 114, p. 104848, 2024.
9. BALTATU, Ovidiu C. *et al.* Melatonin, mitochondria and hypertension. **Cellular and molecular life sciences**, v. 74, p. 3955-3964, 2017.
10. BALTATU, Ovidiu Constantin *et al.* Cardioprotective melatonin: translating from proof-of-concept studies to therapeutic use. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4342, 2019.
11. BAUMBER, J. V. O. A. *et al.* Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1025-1033, 2002.
12. BENZIE, Iris FF; STRAIN, John J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.
13. BILODEAU, Jean-François *et al.* Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1105-1122, 2002.
14. BHAT, M. H. *et al.* Open pulled straw vitrification of in vitro matured sheep oocytes using different cryoprotectants. **Small Ruminant Research**, v. 112, n. 1-3, p. 136-140, 2013.
15. BLAXTER, J. H. S. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. **Nature**, v. 172, n. 4391, p. 1189-1190, 1953.
16. BORGES, J. C. *et al.* Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 3, p. 303-14, 2011.

17. BOS-MIKICH, Adriana *et al.* The use of a metal container for vitrification of mouse ovaries, as a clinical grade model for human ovarian tissue cryopreservation, after different times and temperatures of transport. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 29, p. 1267-1271, 2012.
18. BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
19. BUEGE, John A.; AUST, Steven D. [30] Microsomal lipid peroxidation. In: **Methods in enzymology**. Academic press, 1978. p. 302-310.
20. CABRITA, Elsa *et al.* Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, n. 5, p. 623-635, 2010.
21. CABRITA, Elsa *et al.* Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. **Cryobiology**, v. 50, n. 2, p. 144-153, 2005.
22. CABRITA, Elsa *et al.* The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. **Animal reproduction science**, v. 125, n. 1-4, p. 189-195, 2011.
23. CABRITA, Elsa *et al.* Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. **Aquaculture**, v. 432, p. 389-401, 2014.
24. CAROLSFELD, Joachim *et al.* Migratory fishes of South America. **World Fisheries Trust, Victoria, BC**, 2003.
25. CARLOMAGNO, Gianfranco *et al.* From implantation to birth: insight into molecular melatonin functions. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 9, p. 2802, 2018.
26. CARVALHO, Onofre Ferreira de *et al.* Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, p. 33-38, 2002.
27. CASAO, A. *et al.* Effects of melatonin implants during non-breeding season on sperm motility and reproductive parameters in Rasa Aragonesa rams. **Reproduction in domestic animals**, v. 45, n. 3, p. 425-432, 2010.
28. CASSANI, Paula; BECONI, Martha T.; O'FLAHERTY, Cristian. Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen. **Animal reproduction science**, v. 86, n. 1-2, p. 163-173, 2005.

29. CASTRO, P. L. *et al.* Use of melatonin as an inhibitor of apoptotic process for cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, p. e241081, 2022.
30. CHEN, Christopher. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. **The Lancet**, v. 327, n. 8486, p. 884-886, 1986.
31. CHEN, Yu-Chieh *et al.* Roles of melatonin in fetal programming in compromised pregnancies. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 3, p. 5380-5401, 2013.
32. CHOI, Jung Kyu; HUANG, Haishui; HE, Xiaoming. Improved low-CPA vitrification of mouse oocytes using quartz microcapillary. **Cryobiology**, v. 70, n. 3, p. 269-272, 2015.
33. CIPOLLA-NETO, José; AMARAL, Fernanda Gaspar do. Melatonina como hormônio: novos insights fisiológicos e clínicos. **Revisões endócrinas**, v. 39, n. 6, pág. 990-1028, 2018.
34. COBO, Ana *et al.* Vitrification: an effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients. **Clinical and Translational Oncology**, v. 10, p. 268-273, 2008.
35. COLLINS, Andrew R. *et al.* The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143-151, 2008.
36. CRUZ, Maria Helena Coelho *et al.* Role of melatonin on production and preservation of gametes and embryos: a brief review. **Animal reproduction science**, v. 145, n. 3-4, p. 150-160, 2014.
37. DAVISON, G. W. Exercise and oxidative damage in nucleoid DNA quantified using single cell gel electrophoresis: present and future application, *Front. Physiol.* 7 (2016) 1–7. 2016.
38. DU PLESSIS, Stefan S. *et al.* Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use?. **Asian journal of andrology**, v. 17, n. 2, p. 230-235, 2015.
39. DUBOCOVICH, Margarita L.; MARKOWSKA, Magdalena. Functional MT 1 and MT 2 melatonin receptors in mammals. **Endocrine**, v. 27, p. 101-110, 2005.
40. ESPINO, Javier *et al.* Melatonin as a potential tool against oxidative damage and apoptosis in ejaculated human spermatozoa. **Fertility and sterility**, v. 94, n. 5, p. 1915-1917, 2010.

41. FAVETTA, Laura A. *et al.* High levels of p66shc and intracellular ROS in permanently arrested early embryos. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 8, p. 1201-1210, 2007.
42. FÉLIX, Francisca *et al.* The protective effect of endogenous melatonin on gilthead seabream sperm during cryopreservation. **Aquaculture**, v. 577, p. 739997, 2023.
43. FERREIRA, M. *et al.* The effects of sample size on the outcome of ovarian tissue cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 1, p. 99-102, 2010.
44. FIGUEROA, E. *et al.* Sperm cryopreservation with supplementation of α -tocopherol and ascorbic acid in freezing media increase sperm function and fertility rate in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 493, p. 1-8, 2018.
45. FIGUEROA, Elias *et al.* Effects of cryopreservation on mitochondrial function and sperm quality in fish. **Aquaculture**, v. 511, p. 634190, 2019.
46. FINKEL, Toren; HOLBROOK, Nikki J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-247, 2000.
47. FIRUZI, Omidreza *et al.* Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1721, n. 1-3, p. 174-184, 2005.
48. FORNARI, D. C. *et al.* Increasing storage capability of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos by chilling: development of a useful methodology for hatcheries management. **CryoLetters**, v. 33, n. 2, p. 125-133, 2012.
49. FREITAS, Thaiza Rodrigues de *et al.* Encapsulamento de hidrogel como ferramenta de manipulação e vitrificação de tecido ovariano de peixe-zebra. **Theriogenology**, v. 198, p. 153-163, 2023.
50. DE FREITAS, Thaiza Rodrigues *et al.* Biodegradable capsules as a sustainable and accessible container for vitrification of gonadal tissue using the zebrafish animal model. **Cryobiology**, v. 116, p. 104944, 2024.
51. FRIDOVICH, Irwin. The Biology of Oxygen Radicals: The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity; superoxide dismutases provide an important defense. **Science**, v. 201, n. 4359, p. 875-880, 1978.
52. FUJINOKI, Masakatsu. Melatonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. **Reproduction**, v. 136, n. 5, p. 533, 2008.
53. GALIGUIS, Jason *et al.* Birth of a domestic cat kitten produced by vitrification of lipid polarized in vitro matured oocytes. **Cryobiology**, v. 68, n. 3, p. 459-466, 2014.

54. GALO, Juliana Minardi *et al.* Spermatic abnormalities of piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) after cryopreservation. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, p. 693-699, 2011.
55. GAO, Juan *et al.* Mechanisms of inhibition of excessive microglial activation by melatonin. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 70, p. 1229-1236, 2020.
56. GASCHLER, Michael M.; STOCKWELL, Brent R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 482, n. 3, p. 419-425, 2017.
57. GINSBURG, Anna S. Sperm-egg association and its relationship to the activation of the egg in salmonid fishes. **Development**, v. 11, n. 1, p. 13-33, 1963.
58. GODOY, Leandro Cesar *et al.* A study on the vitrification of stage III zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. **Cryobiology**, v. 67, n. 3, p. 347-354, 2013.
59. GRUNWALD, David Jonah; EISEN, Judith S. Headwaters of the zebrafish—emergence of a new model vertebrate. **Nature reviews genetics**, v. 3, n. 9, p. 717-724, 2002.
60. GUAN, M.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Development of a new method for isolating zebrafish oocytes (*Danio rerio*) from ovary tissue masses. **Theriogenology**, v. 69, n. 3, p. 269-275, 2008.
61. GUAN, M.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes by vitrification. **CryoLetters**, v. 31, n. 3, p. 230-238, 2010.
62. GUO, Shichao *et al.* Melatonin promotes in vitro maturation of vitrified-warmed mouse germinal vesicle oocytes, potentially by reducing oxidative stress through the Nrf2 pathway. **Animals**, v. 11, n. 8, p. 2324, 2021.
63. HABIG, William H.; PABST, Michael J.; JAKOBY, William B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.
64. HAGEDORN, M. *et al.* Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. **Cryobiology**, v. 34, n. 3, p. 251-263, 1997.
65. HARVEY, Brian; KELLEY, R. Norman; ASHWOOD-SMITH, M. J. Cryopreservation of zebra fish spermatozoa using methanol. **Canadian Journal of Zoology**, v. 60, n. 8, p. 1867-1870, 1982.

66. HE, Xiaoming *et al.* Vitrification by ultra-fast cooling at a low concentration of cryoprotectants in a quartz micro-capillary: a study using murine embryonic stem cells. **Cryobiology**, v. 56, n. 3, p. 223-232, 2008.
67. HERMUND, Ditte B. Antioxidant properties of seaweed-derived substances. In: **Bioactive seaweeds for food applications**. Academic Press, 2018. p. 201-221.
68. ISAYEVA, Anna; ZHANG, Tiantian; RAWSON, David M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. **Cryobiology**, v. 49, n. 2, p. 114-122, 2004.
69. JACOBSEN, Charlotte. Oxidative rancidity. 2019.
70. KANG, Bo *et al.* Effect of 3-nitropropionic acid inducing oxidative stress and apoptosis of granulosa cells in geese. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 5, p. BSR20180274, 2018.
71. KARBOWNIK, Małgorzata; REITER, Russel J. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine: Minireviews**, v. 225, n. 1, p. 9-22, 2000.
72. KHOSLA, Kanav *et al.* Gold nanorod induced warming of embryos from the cryogenic state enhances viability. **ACS nano**, v. 11, n. 8, p. 7869-7878, 2017.
73. LERNER, Aaron B.; CASE, James D.; HEINZELMAN, Richard V. Structure of melatonin1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 81, n. 22, p. 6084-6085, 1959.
74. LI, Hongwanyu; LIU, Mei; ZHANG, Cong. Women with polycystic ovary syndrome (PCOS) have reduced melatonin concentrations in their follicles and have mild sleep disturbances. **BMC Women's Health**, v. 22, n. 1, p. 79, 2022.
75. LIU, Ya-Jing *et al.* Melatonin maintains mitochondrial membrane potential and decreases excessive intracellular Ca²⁺ levels in immature human oocytes. **Life Sciences**, v. 235, p. 116810, 2019.
76. LOETCHUTINAT, Chatchanok *et al.* Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate assay. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 72, n. 2-3, p. 323-331, 2005.
77. MACHADO, Gilmara Junqueira *et al.* Cooling of curimba (*Prochilodus lineatus*) embryos using different concentrations of dimethyl sulphoxide and methanol. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 48, p. e20160377, 2019.

78. MATA-CAMPUZANO, María *et al.* Quality, oxidative markers and DNA damage (DNA) fragmentation of red deer thawed spermatozoa after incubation at 37 C in presence of several antioxidants. **Theriogenology**, v. 78, n. 5, p. 1005-1019, 2012.
79. MATTHEWS, Monte; VARGA, Zoltán M. Anesthesia and euthanasia in zebrafish. **ILAR journal**, v. 53, n. 2, p. 192-204, 2012.
80. MARQUES, L. S. Vitriificação de tecido ovariano de zebrafish utilizando uma cápsula demetal. 2014. 84f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2014.
81. MARQUES, Lis S. *et al.* Viability of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles after vitrification in a metal container. **Cryobiology**, v. 71, n. 3, p. 367-373, 2015.
82. MARQUES, Lis S. *et al.* Viability assessment of primary growth oocytes following ovarian tissue vitrification of neotropical teleost pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Cryobiology**, v. 82, p. 118-123, 2018.
83. MARQUES, Lis S. *et al.* Slow freezing versus vitrification for the cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian tissue. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 15353, 2019.
84. MARQUES, Lis *et al.* Effects of melatonin against cryopreservation-induced oxidative stress in zebrafish ovarian tissue. **Cryobiology**, v. 97, p. 297, 2020.
85. MARTIN-HIDALGO, David *et al.* Antioxidants and male fertility: from molecular studies to clinical evidence. **Antioxidants**, v. 8, n. 4, p. 89, 2019.
86. MARTÍNEZ-PÁRAMO, S. *et al.* Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. **Theriogenology**, v. 77, n. 6, p. 1129-1136, 2012.
87. MARTÍNEZ-PÁRAMO, Sonia *et al.* Cryobanking of aquatic species. **Aquaculture**, v. 472, p. 156-177, 2017.
88. MAZUR, Peter; LEIBO, S. P.; SEIDEL JR, George E. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. **Biology of reproduction**, v. 78, n. 1, p. 2-12, 2008.
89. MORRONE, Maurilio Da Silva *et al.* Oral administration of curcumin relieves behavioral alterations and oxidative stress in the frontal cortex, hippocampus, and striatum of ovariectomized Wistar rats. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 32, p. 181-188, 2016.
90. MILIORINI, A. B. *et al.* Cooling of pacu semen (*Piaractus mesopotamicus*) at 4 C using different concentrations of dimethylsulfoxide. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 26, p. 209-11, 2002.

91. MISRA, Hara P.; FRIDOVICH, Irwin. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972.
92. NIRINGIYUMUKIZA, Jean Damascene *et al.* Protective properties of glycogen synthase kinase-3 inhibition against doxorubicin-induced oxidative damage to mouse ovarian reserve. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 116, p. 108963, 2019.
93. NUSSLEIN-VOLHARD, Christiane; DAHM, Ralf (Ed.). **Zebrafish**. Oxford University Press, 2002.
94. OFOSU, Jones *et al.* Use of melatonin in sperm cryopreservation of farm animals: A brief review. **Animal reproduction science**, v. 233, p. 106850, 2021.
95. OSIPOVA, V. P. *et al.* Application of new phenolic antioxidants for cryopreservation of sturgeon sperm. **Cryobiology**, v. 72, n. 2, p. 112-118, 2016.
96. ORTIZ, A. *et al.* High endogenous melatonin concentrations enhance sperm quality and short-term in vitro exposure to melatonin improves aspects of sperm motility. **Journal of pineal research**, v. 50, n. 2, p. 132-139, 2011.
97. PAES, Maria do Carmo Faria. Viabilidade de embriões de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. 2013. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2013
98. PAES, Maria do Carmo Faria; NAKAGHI, Laura Satiko Okada. Post-cooling survival, growth and deformity rates in zebrafish embryos (*Danio rerio*). **Zygote**, v. 26, n. 1, p. 76-88, 2018.
99. PALHARES, Priscila C. *et al.* Sperm characteristics, peroxidation lipid and antioxidant enzyme activity changes in milt of *Brycon orbignyanus* cryopreserved with melatonin in different freezing curves. **Theriogenology**, v. 176, p. 18-25, 2021.
100. PAULA, Daniella AJ *et al.* Toxicity of cryoprotectants on *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837)(curimba) embryos in an experimental incubator (Characiformes: Prochilodontidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 12, n. 4, p. 835-844, 2014.
101. PÉREZ-CEREZALES, Serafín *et al.* Evaluation of oxidative DNA damage promoted by storage in sperm from sex-reversed rainbow trout. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 605-613, 2009.
102. POOL, K. R. *et al.* Treatment of rams with melatonin implants in the non-breeding season improves post-thaw sperm progressive motility and DNA integrity. **Animal Reproduction Science**, v. 221, p. 106579, 2020.

103. PUJOL, A. *et al.* Comparison of two different oocyte vitrification methods: a prospective, paired study on the same genetic background and stimulation protocol. **Human reproduction**, v. 34, n. 6, p. 989-997, 2019.
104. RAHMAN, Sk M. *et al.* Electroporation enhances permeation of cryoprotectant (dimethyl sulfoxide) into Japanese whiting (*Sillago japonica*) embryos. **Theriogenology**, v. 79, n. 5, p. 853-858, 2013.
105. RAJABI, Zahra; KHOKHAR, Zunair; YAZDEKHASTI, Hossein. The growth of preantral follicles and the impact of different supplementations and circumstances: a review study with focus on bovine and human preantral follicles. **Cellular reprogramming**, v. 20, n. 3, p. 164-177, 2018.
106. REITER, Russel J. Melatonin: lowering the high price of free radicals. **Physiology**, v. 15, n. 5, p. 246-250, 2000.
107. REITER, Russel J. *et al.* Melatonin and reproduction revisited. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 3, p. 445-456, 2009.
108. RIESCO, Marta F. *et al.* Comparative study on cellular and molecular responses in oyster sperm revealed different susceptibilities to cryopreservation. **Aquaculture**, v. 498, p. 223-229, 2019.
109. ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 722, n. 1-2, p. 225-254, 1999.
110. SANDOVAL-VARGAS, L. *et al.* Oxidative stress and use of antioxidants in fish semen cryopreservation. *Rev. Aquac.* 13, 365–387. 2021.
111. SANTOS, R. R. *et al.* Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. **Animal reproduction science**, v. 122, n. 3-4, p. 151-163, 2010.
112. SANTOS, Ramison *et al.* Melatonin Improves Nitric Oxide Bioavailability in Isoproterenol Induced Myocardial Injury. **Molecular and Cellular Endocrinology**, p. 112279, 2024.
113. SARAGUSTY, Joseph; ARAV, Amir. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, v. 141, n. 1, p. 1, 2011.
114. SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N. *et al.* The human myometrium as a target for melatonin. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 2, p. 908-913, 2003.

115. SHARIFI-RAD, Mehdi *et al.* Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. **Frontiers in physiology**, v. 11, p. 694, 2020.
116. SHI, Jian-Min *et al.* Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves in vitro maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. **Journal of pineal research**, v. 47, n. 4, p. 318-323, 2009.
117. SIMON, H.-U.; HAJ-YEHIA, A.; LEVI-SCHAFFER, Francesca. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. **Apoptosis**, v. 5, p. 415-418, 2000.
118. SMITH, Gary D.; MOTTA, Eduardo E.; SERAFINI, Paulo. Theoretical and experimental basis of oocyte vitrification. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 23, n. 3, p. 298-306, 2011.
119. SINGH, Narendra P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.
120. SOUZA, W. L.; MORAIS, Elenice Andrade. Atividade antioxidante da melatonina sobre o estresse oxidativo em espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 13, p. 4831-4839, 2016.
121. STRADAIOLI, Giuseppe *et al.* Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. **Theriogenology**, v. 67, n. 7, p. 1249-1255, 2007.
122. STREIT JÚNIOR, Danilo Pedro *et al.* Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1199-1202, 2007.
123. STREIT-JR., Danilo Pedro *et al.* Qualitative parameters of the piapara semen (*Leporinus elongatus* Valenciennes, 1850). **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 2, p. 373-377, 2008.
124. STURMEY, R. G. *et al.* Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 50-58, 2009.
125. SUCCU, Sara *et al.* Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. **Journal of Pineal Research**, v. 50, n. 3, p. 310-318, 2011.

126. SUN, Tie Cheng *et al.* Melatonin inhibits oxidative stress and apoptosis in cryopreserved ovarian tissues via Nrf2/HO-1 signaling pathway. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, p. 163, 2020.
127. SUQUET, Marc *et al.* Cryopreservation of sperm in marine fish. **Aquaculture Research: Original Articles**, v. 31, n. 3, p. 231-243, 2000.
128. TAN, Dun-Xian *et al.* Emergence of naturally occurring melatonin isomers and their proposed nomenclature. **Journal of Pineal Research**, v. 53, n. 2, p. 113-121, 2012.
129. TAYLOR, Clare T. Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 189-198, 2001.
130. TIAN, Yongsheng *et al.* Sperm cryopreservation of sex-reversed seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. **Animal reproduction science**, v. 137, n. 3-4, p. 230-236, 2013.
131. TIAN, Yongsheng *et al.* Effects of cryopreservation at various temperatures on the survival of kelp grouper (*Epinephelus moara*) embryos from fertilization with cryopreserved sperm. **Cryobiology**, v. 75, p. 37-44, 2017.
132. TIERSCH, Terrence R. *et al.* (Ed.). Cryopreservation in aquatic species. 2000.
133. TONG, Jing *et al.* Melatonin levels in follicular fluid as markers for IVF outcomes and predicting ovarian reserve. **Reproduction**, v. 153, n. 4, p. 443-451, 2017.
134. TORDJMAN, Sylvie *et al.* Melatonin: pharmacology, functions and therapeutic benefits. **Current neuropharmacology**, v. 15, n. 3, p. 434-443, 2017.
135. TORRES, Thais Maia *et al.* Effects of taurine, cysteine and melatonin as antioxidant supplements to the freezing medium of *Prochilodus brevis* sperm. **Cryobiology**, p. 104858, 2024.
136. TRUONG, Thi T.; GARDNER, David K. Antioxidants increase blastocyst cryosurvival and viability post-vitrification. **Human reproduction**, v. 35, n. 1, p. 12-23, 2020.
137. TSAI, S.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Development of in vitro culture method for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles for use in cryopreservation studies. **Theriogenology**, v. 74, n. 2, p. 290-303, 2010.
138. VAJTA, Gabor. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 357-364, 2000.

139. VIVEIROS, Ana Tereza de Mendonça; GODINHO, Hugo Pereira. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 137-150, 2009.
140. XING, Xupeng *et al.* Coenzyme Q10 supplement rescues postovulatory oocyte aging by regulating SIRT4 expression. **Current Molecular Pharmacology**, v. 15, n. 1, p. 190-203, 2022.
141. YANG, Ziwei *et al.* Controlling chronic low-grade inflammation to improve follicle development and survival. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 84, n. 2, p. e13265, 2020.
142. YILDIZ, Cengiz; BOZKURT, Yusuf; YAVAS, Ilker. An evaluation of soybean lecithin as an alternative to avian egg yolk in the cryopreservation of fish sperm. **Cryobiology**, v. 67, n. 1, p. 91-94, 2013.
143. WANG, Gongfa *et al.* Upregulation of uncoupling protein Ucp2 through acute cold exposure increases post-thaw sperm quality in zebrafish. **Cryobiology**, v. 71, n. 3, p. 464-471, 2015.
144. WOO, Michelle MM *et al.* Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 10, p. 4789-4797, 2001.
145. ZAMPOLLA, T.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicle viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate and propidium iodide. **CryoLetters**, v. 29, n. 6, p. 463-475, 2008.
146. ZAMPOLLA, Tiziana *et al.* Cytoskeleton proteins F-actin and tubulin distribution and interaction with mitochondria in the granulosa cells surrounding stage III zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. **Theriogenology**, v. 76, n. 6, p. 1110-1119, 2011.
147. ZANIBONI-FILHO, Evoy; BALDISSEROTTO, Bernardo. Congelamento de sêmen e tecidos de peixes brasileiros. **Rev. bras. reprod. anim**, p. 189-194, 2015.
148. ZHANG, Zhiguo *et al.* Melatonin improves the effect of cryopreservation on human oocytes by suppressing oxidative stress and maintaining the permeability of the oolemma. **Journal of Pineal Research**, v. 70, n. 2, p. e12707, 2021.
149. ZHANG, Chao *et al.* Melatonin application during cryopreservation improves the development and clinical outcomes of human vitrified-warmed oocytes. **Cryobiology**, v. 115, p. 104902, 2024.

150. ZHAO, Xue-Ming *et al.* Melatonin enhances the in vitro maturation and developmental potential of bovine oocytes denuded of the cumulus oophorus. **Zygote**, v. 23, n. 4, p. 525-536, 2015.
151. ZIDNI, Irfan *et al.* Effect of antioxidants in cryopreservation media on spotted halibut (*Verasfer variegatus*) sperm quality during cryopreservation. **Aquaculture**, v. 557, p. 738351, 2022.



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CARTA DE APROVAÇÃO/ADENDO

Número: 36018

Título: Ação antioxidante da melatonina em sêmen criopreservado de Zebrafish (*Danio rerio*)

Pesquisador Responsável: DANILO PEDRO STREIT JR

A Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o Adendo ao Projeto de nº 36018 em reunião realizada em 24/11/2019 – Plenarinho – Andar Térreo do Prédio da Reitoria - Campus Centro - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para utilização de trinta fêmeas de *Danio rerio*; 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. **Este documento revoga a Carta de Aprovação emitida anteriormente.**

Porto Alegre, 06 de dezembro de 2019.

Alexandre Tavares Duarte de Oliveira

Coordenador da CEUA/UFRGS