

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

Renata Villar Dantas

**Viabilidade oocitária e espermática em zebrafish (*Danio rerio*) post  
*mortem***

Porto Alegre

2023

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

**Viabilidade oocitária e espermática em zebrafish (*Danio rerio*) post  
*mortem***

Renata Villar Dantas

Bióloga/Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

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

Porto Alegre (RS), Brasil

Abril de 2023

### CIP - Catalogação na Publicação

Dantas, Renata Villar  
Viabilidade oocitária e espermática em zebrafish  
(Danio rerio) post mortem / Renata Villar Dantas. --  
2023.  
62 f.  
Orientador: Danilo Pedro Streit Junior.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Danio rerio. 2. viabilidade oocitária. 3.  
viabilidade espermática. 4. post mortem. 5. Zebrafish.  
I. Streit Junior, Danilo Pedro, orient. II. Título.

Renata Villar Dantas  
Bióloga

## 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: 31.03.2023  
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 07/06/2023  
Por



Documento assinado digitalmente  
DANILO PEDRO STREIT JR  
Data: 19/04/2023 11:17:43-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Sergio Luiz Vieira

Assinado de forma digital por  
Sergio Luiz Vieira  
Dados: 2023.06.14 11:17:16 -03'00'

DANILO PEDRO STREIT JUNIOR  
PPG Zootecnia/UFRGS  
Orientador

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



Documento assinado digitalmente  
DARLAN GUSSO  
Data: 19/04/2023 18:39:32-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Darlan Gusso  
UFRGS



Documento assinado digitalmente  
DIOGENES HENRIQUE DE SIQUEIRA SILVA  
Data: 10/04/2023 13:48:58-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Diogenes Henrique de Siqueira Silva  
UNIFESSPA



Documento assinado digitalmente  
FRANCIELLI WEBER SANTOS CIBIN  
Data: 19/04/2023 16:36:01-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Franccielli Weber Santos Cibirin  
UNIPAMPA



Documento assinado digitalmente  
CARLOS ALBERTO BISSANI  
Data: 16/06/2023 15:38:43-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

CARLOS ALBERTO BISSANI  
Diretor da Faculdade de  
Agronomia

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a minha mãe Angela e meu marido e melhor amigo Vinícius, por todo o companheirismo e por apoiarem a minha escolha de realizar este mestrado.

Agradeço à Lis Marques, pela amizade e que me incentivou, me apoiou a fazer esta escolha e me apresentou a família AQUAM.

Agradeço ao meu orientador Danilo Pedro Streit Junior, que aceitou o desafio de me orientar, confiou em mim e me acolheu, mesmo com a minha falta de experiência na área.

Agradeço à Thaiza Freitas, à Nathalia Teixeira e ao Rômulo Rodrigues, pessoas incríveis e especiais que, com toda a paciência do mundo me ensinaram, deram suporte durante estes dois anos, e foram essenciais para realizar a parte experimental e estatística deste trabalho. Muito obrigada, de todo o meu coração.

Agradeço ao Jhony Lisboa, que me auxiliou realizando as análises de motilidade espermática; à Raquel Santos, que esteve presente nos experimentos, e auxiliando com as lâminas lá no Pará; à Ana Paula Balbinot, por me ensinar a confeccionar as lâminas de morfologia espermática; ao Diogo Araújo, Tales Fabris e Larise Lima pela amizade; e a todos do AQUAM pela acolhida e amizade, que foram essenciais nesta caminhada.

Agradeço ao Prof. Diógenes Siqueira, por realizar a leitura das lâminas histológicas; Wanderson Valente, por confeccionar as lâminas histológicas; ao INTOX-PUCRS, à Profa. Dra. Maria Martha Campos e Anna Vieira, por disponibilizar o leitor de microplacas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro durante o período de Mestrado e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

## Viabilidade oocitária e espermática em zebrafish (*Danio rerio*) *post-mortem*<sup>1</sup>

Autor: Renata Villar Dantas

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

**Resumo:** A exploração excessiva dos ambientes aquáticos tem acarretado o declínio de diversas espécies de peixes, fazendo-se necessária a adoção de medidas mitigatórias que visem a proteção destes animais em risco de extinção. A remoção de gônadas de animais encontrados mortos, desde que sejam viáveis, pode ser uma alternativa de preservação dessas espécies, porém os efeitos do processo de *post mortem* na qualidade dos gametas de espécies aquáticas têm sido pouco estudados. Sendo assim, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos de três períodos do *post mortem* (*pré-rigor mortis*, *rigor mortis* e *post rigor*) em diferentes parâmetros de qualidade de oócitos e espermatozoides, utilizando como modelo o zebrafish. Os peixes foram eutanasiados por imersão em anestésico triclaína (0,6 mg/mL; 27°C ±0,5; pH 7,4) e mensurados de acordo com angulação em transferidor (180°), estabelecendo ângulos referentes a cada etapa do *post mortem* (*fresco/controle*–40°; *pré-rigor mortis*–35°; *rigor mortis*–0°; *post rigor*–40°), coletando os tecidos em cada etapa. As seguintes análises foram realizadas: viabilidade celular (SYBR-14/FDA/PI), atividade mitocondrial (MTT), morfologia espermática (Rosa de Bengala) e cinética de espermatozoides (CASA). Na atividade mitocondrial de oócitos e espermatozoides não houve diferença. No período do *post rigor*, todos os estágios de maturação oocitária apresentaram baixa viabilidade celular (5,145 - 15,22%). Não houve diferença entre os grupos na viabilidade dos espermatozoides ( $p=0,0822$ ). Em contraste, no *rigor mortis* e *post rigor*, a motilidade espermática foi inferior à 20% ( $p<0,05$ ) comparado ao *pré-rigor mortis* (58,96± 14,38%) e o *fresco/controle* (63,23 ± 19,03%). Os resultados de morfologia espermática mostram uma maior quantidade de anormalidades de cabeça nos períodos de *rigor mortis* e *post rigor*. No *post rigor*, além de cabeça degenerada (8,7 ± 2,29%), houve um aumento de microcefalia (8,4 ± 2,33%) e cauda curta (16 ± 5,13%). Esses resultados indicam que o *rigor mortis* seria o momento limite para a coleta e preservação de gônadas após a morte do animal, visto que no *post rigor* há uma perda da qualidade dos gametas de zebrafish.

**Palavras-chave:** conservação; *Danio rerio*; gônadas; *post rigor*.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (p.64) Abril, 2023.

## Post-mortem oocyte and sperm viability in zebrafish (*Danio rerio*)<sup>1</sup>

Author: Renata Villar Dantas

Advisor: Danilo Pedro Streit Jr.

**Abstract:** Excessive exploitation of aquatic environments has led to the decline of several species of fish, making it necessary to adopt mitigation measures aimed at protecting these animals at risk of extinction. The removal of gonads from animals found dead, if they are viable, can be an alternative for the preservation of these species, however, the effects of the *post-mortem* process on the quality of gametes of aquatic species have been little studied. Therefore, the study's objective was to evaluate the effects of three *post-mortem* periods (*pre-rigor mortis*, *rigor mortis*, and *post-rigor*) on different quality parameters of oocytes and spermatozoa, using zebrafish as a model. The fish were euthanized by immersion in tricaine anesthetic (0.6 mg/mL; 27°C ±0.5; pH 7.4) and measured according to the angulation in a protractor (180°), establishing angles referring to each stage of the process *post-mortem* (*fresh/control*–40°; *pre-rigor mortis* –35°; *rigor mortis*–0°; *post-rigor*–40°), collecting tissues at each stage. The following analyzes were performed: cell viability (SYBR-14/FDA/PI), mitochondrial activity (MTT), sperm morphology (Rose Bengal), and sperm kinetics (CASA). There was no difference in the mitochondrial activity of oocytes and spermatozoa. In the *post-rigor* period, all oocyte maturation stages showed low cell viability (5.145 - 15.22%). There was no difference between groups in sperm viability ( $p=0.0822$ ). In contrast, in *rigor mortis* and *post-rigor*, sperm motility was less than 20% ( $p<0.05$ ) compared to *pre-rigor mortis* ( $58.96 \pm 14.38\%$ ) and *fresh/control* ( $63.23 \pm 19.03\%$ ). Sperm morphology results show a greater amount of head abnormalities in the periods of *rigor mortis* and *post rigor*. In *post rigor*, in addition to degenerated head ( $8.7 \pm 2.29\%$ ), there was an increase in microcephaly ( $8.4 \pm 2.33\%$ ) and short tail ( $16 \pm 5.13\%$ ). These results indicate that *rigor mortis* would be the limit moment for collecting and preserving gonads after the animal's death, since in *post rigor* there is a loss of quality of zebrafish gametes.

**Keywords:** conservation; *Danio rerio*; gonads; *post rigor*.

---

<sup>1</sup> Masters dissertation in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (64 p.) April, 2023.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
2.1	PROCESSOS DE <i>RIGOR MORTIS</i> E <i>POST MORTEM</i> EM PEIXES.....	18
2.1.1	<i>Métodos de avaliação de viabilidade celular post mortem</i> .....	18
2.2	ZEBRAFISH ( <i>DANIO RERIO</i> ) COMO MODELO BIOLÓGICO .....	19
2.2.1	<i>Estrutura ovariana de zebrafish (Danio Rerio)</i> .....	21
2.2.2	<i>Desenvolvimento de oócitos em zebrafish</i> .....	21
2.3	ESTRUTURA TESTICULAR DE ZEBRAFISH ( <i>DANIO RERIO</i> ) .....	24
2.3.1	<i>Espmatogênese em zebrafish (Danio rerio)</i> .....	25
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>27</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
4.1	CONTROLE AMBIENTAL E CUIDADOS COM OS ANIMAIS .....	28
4.2	ÍNDICE DE RIGOR MORTIS EM ZEBRAFISH ( <i>DANIO RERIO</i> ).....	29
4.3	COLETA DE TECIDOS TESTICULARES E OVARIANOS.....	31
4.3.1	<i>Fêmeas</i> .....	31
4.3.2	<i>Machos</i> .....	33
<b>5</b>	<b>DESENHO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>ANÁLISES DE VALIDAÇÃO</b> .....	<b>35</b>
6.1	ENSAIO MTT – ATIVIDADE MITOCONDRIAL.....	35
6.2	VIABILIDADE CELULAR – OÓCITOS E ESPERMATOZOÍDES - LIVE/DEAD.....	36
6.3	ANÁLISE ESPERMÁTICA ASSISTIDA POR COMPUTADOR (CASA) .....	38
6.4	MORFOLOGIA ESPERMÁTICA.....	38
<b>7</b>	<b>ANÁLISES ESTATÍSTICAS</b> .....	<b>40</b>
<b>8</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
8.1	FÊMEAS .....	40
8.1.1	<i>Atividade mitocondrial – Ensaio MTT</i> .....	40
8.1.2	<i>Viabilidade celular – Live/Dead</i> .....	41
8.2	MACHOS .....	43
8.2.1	<i>Viabilidade celular e atividade mitocondrial</i> .....	43
8.2.2	<i>Cinética Espermática</i> .....	45
8.2.3	<i>Morfologia Espermática</i> .....	47
<b>9</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>52</b>
<b>10</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>55</b>
10.1	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	56
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>57</b>
	<b>VITA</b> .....	<b>64</b>



## RELAÇÃO DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1</b> . Dimorfismo sexual em zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ).....	19
<b>Figura 2</b> . Desenvolvimento oocitário em truta marinha pintada ( <i>Cynoscion nebulosus</i> ).....	23
<b>Figura 3</b> . Anatomia do testículo do zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ).....	24
<b>Figura 4</b> . <b>A)</b> Avaliação biométrica em zebrafish com paquímetro digital; <b>B)</b> Avaliação do índice de rigor. ....	29
<b>Figura 5</b> . Zebrafish em placa de petri..	30
<b>Figura 6</b> . Coleta de testículos e ovários em zebrafish .....	32
<b>Figura 7</b> . Ovários de zebrafish em solução de L-15 (Leibovitz) 90%, pH 9.....	33
<b>Figura 8</b> . Desenho experimental ilustrando experimentos realizados com o modelo experimental zebrafish.....	35
<b>Figura 9</b> . Ensaio MTT - Placas de 96 poços com amostras, para leitura em espectrofotômetro. ....	36
<b>Figura 10</b> . Avaliação de viabilidade celular (LIVE/DEAD) de oócitos, em diferentes estádios de desenvolvimento, .....	37
<b>Figura 11</b> . Lâminas coradas para morfologia espermática zebrafish. ....	39
<b>Figura 12</b> . Atividade mitocondrial em fragmentos de tecido ovariano .....	41
<b>Figura 13</b> . Viabilidade celular de oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento .....	42
<b>Figura 14</b> . Viabilidade celular, espermatozoides com morfologia normal e atividade mitocondrial de espermatozoides de zebrafish coletados em diferentes estágios de <i>rigor mortis</i> . ....	44
<b>Figura 15</b> . Variáveis do CASA de sêmen de zebrafish coletados em diferentes estágios de <i>rigor mortis</i> .....	46
<b>Figura 16</b> . Patologias de cabeça e de gota citoplasmática em espermatozoides de zebrafish coletados em diferentes estágios de <i>rigor mortis</i> .....	48
<b>Figura 17</b> . Patologias de cauda em espermatozoides de zebrafish coletados em diferentes estágios de <i>rigor mortis</i> . ....	50
<b>Figura 18</b> . Comparação entre os diferentes tipos de patologias de espermatozoides de zebrafish coletados em diferentes estágios de <i>rigor mortis</i> , para cada grupo experimental.....	51

## RELAÇÃO DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Relação dos tratamentos e ângulos para determinação do estágio de rigor mortis em fêmeas e machos de zebrafish.....	30
--	----

## LISTA DE ABREVIÇÕES

ICSI	injeção intracitoplasmática de espermatozoides
ATP	adenosina trifosfato
±	mais ou menos
µg	micrograma
µm	micrômetro
µL	microlitro
°C	grau celsius
CA	alvéolo cortical
Cp	crescimento pimário
DNA	ácido desoxirribonucléico
G	força G (força gravitacional)
g	grama
IP	iodeto de propídio
M	molar
Me <sub>2</sub> SO	dimetilsufóxido
mg	miligrama
min	minuto
pH	potencial hidrogeniônico
Aund	espermato gênio do tipo A indiferenciada
Adif	espermato gênio do tipo A diferenciada
Vtg1	vitelogenico primário
Vtg2	vitelogenico secundário
Vtg3	vitelogenico terciário

FDA	diacetato de fluoresceína
MTT	reagente (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio))
cm	centímetro
%	percentagem
H	hora
Dpf	dias pós fertilização
PGC	células germinativas primordiais
SSC	spermatogonial stem cell; espermatogônia-tronco
L	litro
>	maior que
HBSS	solução salina balanceada de Hank
L-15	meio Leibovitz
mm	milímetro
CASA	Computer Assisted Sperm Analysis Software
nm	nanômetro
VCL	curvilinear velocity; velocidade espermática curvilínea
VAP	average path velocity; velocidade média do deslocamento
VSL	straight-line velocity; velocidade espermática em linha reta
STR	straightness; retilinearidade
WOB	wobble; oscilação
PROG	progressão
BCF	beat cross frequency; frequência de batida cruzada

## 1 INTRODUÇÃO

Grande parte das espécies de peixes, assim como as áreas de pesca que as sustentam, encontram-se em declínio em todo o mundo (Palacios-Abrantes *et al.*, 2020). Entre as espécies marinhas, 63% dos estoques de peixes são plenamente explorados ou sobre-explorados (FAO, 2022). Essa exploração já levou ao colapso muitas áreas de pesca do mundo, seja das grandes espécies predatórias, seja de peixes pequenos em níveis tróficos baixos (Pedersen *et al.*, 2017). Além disso, a captura acidental tem sido implicada no aumento de espécies marinhas ameaçadas de extinção (Jordan *et al.*, 2013; Zimmerhackel *et al.*, 2015; Hazen *et al.*, 2018). Ecossistemas de água doce também estão sob pressões intensas, com a biodiversidade de peixes ameaçada pela pesca excessiva, destruição de habitat e poluição (Tickner *et al.*, 2020), e de acordo com a FAO (2022), cerca de 37% dos estoques de peixes de água doce foram capturados. Diante deste contexto, a adoção de medidas mitigatórias para a proteção efetiva das espécies de peixes e seus habitats é urgente.

O desenvolvimento da aquicultura, em conjunto com a necessidade de preservação de espécies ameaçadas de extinção, estimulou o interesse na preservação dos recursos genéticos das espécies (De Carvalho *et al.*, 2014). Para a preservação de tais recursos genéticos, destaca-se a técnica de criopreservação, considerada uma importante biotécnica reprodutiva, visto que promove a conservação do germoplasma por tempo indeterminado, e tem sido importante para manutenção da diversidade de espécies, e para gestão de peixes, que são modelos experimentais na área biomédica e na aquicultura (Tsai *et al.*, 2010). Além disso a técnica facilita o transporte do material a longas distâncias, e inclusive, possibilita a utilização dos gametas de reprodutores encontrados mortos, podendo, por exemplo, ser realizadas coletas de suas gônadas para retirada dos gametas. Esta biotecnologia vem sendo estudada devido ao seu potencial em tratamentos de infertilidade, estocagem de DNA de animais de alto valor zootécnico, transgênicos ou espécies em perigo de extinção (Santos *et al.*, 2010).

A obtenção de tecido testicular ou ovariano criopreservado coletado *post mortem* é um meio potencial de preservar o material genético de espécies aquáticas

ameaçadas de extinção, ou de importantes reprodutores em pisciculturas, encontradas mortas ou que morreram inesperadamente. Estudos prévios em diferentes espécies animais (mamíferos e peixes) mostram que descendentes podem ser produzidos usando o espermatozoide congelado-descongelado através de sua injeção intracitoplasmática, através de transplante de tecido testicular, assim como de células germinativas (Shinohara *et al.*, 2002; Tharasanit *et al.*, 2012; Octavera *et al.*, 2020).

A coleta de sêmen de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), realizada *post mortem*, prolongada ( $\geq 40-60$  min) e armazenadas à 6°C, alterou significativamente os parâmetros de motilidade espermática (Dietrich *et al.*, 2005). Espécimes preservados *post mortem*, armazenadas a -20°C por 240 dias de bagre indiano (*Heteropneustes fossilis*) apresentaram espermatozoides vivos férteis (Koteeswaran; Pandian, 2002). O objetivo do estudo citado consistiu em avaliar a viabilidade espermática do sêmen coletado em diferentes momentos após a morte dos peixes que foram previamente estocados e resfriados.

Avaliar se diferentes momentos no processo de *rigor mortis* afetam a viabilidade de tecidos e gametas coletados, fornecerá uma resposta padronizada para, posteriormente, auxiliar no desenvolvimento de protocolo de criopreservação em diferentes espécies de peixes. Até o momento, nenhum estudo relacionou os índices de *rigor mortis* (períodos que antecedem o *rigor mortis*, o rigor pleno e o período após o *rigor mortis*), com a viabilidade e morfologia de espermatozoides e oócitos coletados frescos e criopreservados, após a morte do peixe.

Para a elaboração de um protocolo de criopreservação a ser aplicado em espécies ameaçadas, como tubarões e raias, o modelo experimental zebrafish (*Danio rerio*) foi utilizado nos experimentos, pois, além de ser pequeno, fácil de ser obtido e mantido em laboratório, é um modelo amplamente aceito e difundido na comunidade científica.

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência dos índices de *rigor mortis* em modelo zebrafish, a partir da análise de espermatozoides e oócitos, avaliando os índices de *rigor mortis* dos animais e a viabilidade destas células, para futuro desenvolvimento de um protocolo de criopreservação dos tecidos e gametas de espécies aquáticas ameaçadas, ou de importantes reprodutores da piscicultura.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Processos de *rigor mortis* e *post mortem* em peixes

Após a morte de um peixe, mudanças consideráveis ocorrem no corpo. As alterações, no entanto, variam com base no tamanho e espécie, condição física, estação do ano e circunstância da morte. Entretanto, em todos os peixes, o controle do cérebro, bem como a circulação sanguínea, cessa após a morte. Isso resulta na incapacidade de ressintetizar ATP e transportar os componentes essenciais para manutenção da vitalidade celular. O enrijecimento do tecido muscular, conhecido como *rigor mortis*, ocorre mais cedo ou mais tarde e a glicólise forma alguns ácidos orgânicos, como por exemplo o ácido láctico, que reduzem os valores de pH (Wheaton; Lawson, 1985). Após o término do *rigor mortis*, o tecido muscular perde a rigidez, seguido de autólise formando aminoácidos e outros compostos de baixo peso molecular, tais como inosina, ribose, creatina, lactato e ureia. Em seguida, os microrganismos crescem utilizando esses compostos que existem antes e depois da autólise e, subsequentemente, atacam os compostos de alto peso molecular. Durante a deterioração por microrganismos, algumas substâncias putrefativas específicas, como a trimetilamina e a histamina, são formadas dependendo das espécies de peixes (Huss, 1997). As alterações *post mortem* incluem autólise e putrefação (degradação bacteriana dos órgãos). A definição de autólise é a autodigestão ou degradação das células por enzimas hidrolíticas que estão normalmente presentes em células *post mortem* (Carson; Hladik, 2009; Mukundan *et al.*, 1986; Zdravković, *et al.*, 2006; George *et al.*, 2016).

A degradação dos tecidos após a morte de um animal resulta de mecanismos básicos, tais como a autólise enzimática, a oxidação e o crescimento microbiano. Logo após a morte, ocorrem mudanças químicas e biológicas, onde enzimas endógenas são liberadas em decorrência da perda da integridade celular e quebra de membranas celulares (Huss, 1997).

Fatores como a microbiota, estresse, manejo dos animais, o tipo de ambiente, status sanitário, temperatura e pH estão relacionados com alterações *post mortem* em peixes (Heil, 2009; Mukundan *et al.*, 1986 George *et al.*, 2016). Determinados órgãos,

tais como brânquias e trato intestinal, também podem ser mais suscetíveis à autólise em relação a outros órgãos (Mallat, 1985; Speare; Ferguson, 1989, Furnesvik *et al.*2022). De modo geral, órgãos de peixes tendem a apresentar taxas de degradação mais aceleradas em comparação aos mamíferos (Ferguson, 2006). Uma possível justificativa seria a utilização de glicose e glicogênio nas células de peixes, resultantes do estresse por manejo e/ou transporte, acarretando uma elevação dos níveis de ácido láctico, diminuição do pH e exacerbação da autólise no momento da morte (Gatica *et al.*, 2008; Mukundan *et al.*, 1986; George *et al.*, 2016, Furnesvik *et al.*2022).

O intervalo entre a morte de um animal e a remoção dos tecidos testicular e ovariano *post mortem*, é um fator importante que afeta a morfologia (Bryant; Boekelheide, 2007). Diferentes fatores exógenos e endógenos contribuem para a destruição e decomposição destes tecidos. Fatores endógenos são autólise, putrefação e decomposição, enquanto fatores exógenos incluem predação animal, exposição a diversos elementos (temperatura ambiental e ação de insetos) e lesão mecânica (Brooks, 2016). As paradas circulatória e respiratória são seguidas por alterações *post mortem* iniciais, como lividez *post mortem* e *rigor mortis*, os quais são utilizados para estimar a hora da morte. O *rigor mortis* é caracterizado pela perda da plasticidade e extensibilidade dos músculos como resultado da alteração dos ciclos de contração e relaxamento muscular (Contreras, 1994). O processo de *rigor mortis* apresenta três fases: (I) o *pré-rigor mortis*, que ocorre antes do estabelecimento do *rigor mortis* propriamente dito, quando está ocorrendo o enrijecimento muscular; (II) o *rigor mortis* pleno, período em que o *rigor mortis* está estabelecido; e (III) o *post rigor*, quando ocorre a resolução do rigor mortis, caracterizado pela perda da rigidez muscular (Fontenele *et al.*, 2013).

Em geral, para avaliação do índice de *rigor mortis*, peixes maiores devem ser colocados sobre um plano horizontal, de forma que a metade do corpo (região caudal) fique suspensa. Em intervalos de tempos selecionados define-se o índice de rigor de acordo com a seguinte equação:

$$IR (\%) = [(D0-Dt) / D0] \times 100$$

Onde,

*IR* = Índice de Rigor.

*D0* = Distância inicial entre a superfície da mesa e a base da nadadeira caudal.

*Dt* = Distância final entre a superfície da mesa e a base da nadadeira caudal.



Antes de iniciar o *rigor mortis*,  $Dt = D_0$ , então o índice é 0%; no início do rigor, a parte caudal se levanta e, conseqüentemente, vai gradualmente reduzindo a distância  $Dt$ ; quando atinge o rigor máximo,  $Dt = 0$  e o índice é 100% (Ogawa; Maia, 1999). Porém, para peixes menores, como zebrafish (*Danio rerio*), de acordo com o estabelecido por Dunford *et al.*, (2019), a avaliação dos índices de *rigor mortis* sugerida seria com o uso de um transferidor, mensurando a angulação em que o animal atinge, conforme o processo de *rigor mortis* ocorre.

O tempo que um peixe leva para entrar e passar pelo *rigor mortis* depende dos seguintes fatores: a espécie, seu tamanho, sua condição física, o grau de exaustão antes da morte e a temperatura em que está mantido (Wheaton; Lawson, 1985; Korhonen; Lanier, 1990). O atordoamento e morte por hipotermia (água resfriada), por exemplo, proporcionam um aumento do tempo no estado de *rigor mortis* e, se o peixe for eviscerado e descabeçado imediatamente, este tempo poderá se estender até 18 horas. Geralmente, o declínio do pH *post mortem* e o início do *rigor mortis* são concluídos em uma a oito horas após a morte, embora o rigor possa ser concluído em apenas 30 minutos (Delbarre-Ladrat *et al.*, 2006).

Algumas espécies levam mais tempo que outras para entrar em rigor, devido às diferenças em sua composição química. Assim como peixes pequenos geralmente entram em rigor mais rapidamente que peixes grandes da mesma espécie. Além disso, quanto pior a condição física de um peixe, como por exemplo animais desnutridos ou que tenha realizado recentemente a desova, menor será o tempo para entrar em rigor, o que é justificado pela escassa reserva de energia no músculo para mantê-lo flexível. Do mesmo modo, peixes que lutaram na rede por um tempo mais prolongado antes de serem içados a bordo e eviscerados, terão muito menos reserva de energia em comparação com aqueles que entraram na rede pouco antes de puxar e, portanto, entrarão em rigor mais rapidamente. A temperatura é um fator muito importante que influencia o tempo em que o peixe necessita para entrar e passar pelo rigor. Quanto mais quente o peixe, mais rápido ele entrará no rigor e passará pelo rigor. Portanto, peixes pequenos, com poucas reservas de energia, que se encontram exaustos, em pior condição física, e mantidos a alta temperatura, entrarão e passarão pelo rigor muito rapidamente. Por outro lado, peixes grandes, descansados e bem alimentados, mantidos em baixa temperatura, demoram muito para entrar e passar pelo rigor (Stroud, 1969).

### 2.1.1 Métodos de avaliação de viabilidade celular *post mortem*

Os efeitos dos processos de degradação celular *post mortem* podem ser avaliados através de metodologias que determinem a viabilidade e qualidade das células. Entre os métodos, destacam-se a avaliação de atividade mitocondrial (Ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio)), viabilidade celular plasmática, morfologia e análise de motilidade espermática.

O processo de degradação celular em virtude da morte de um animal, pode causar a ruptura das membranas celulares, que conseqüentemente leva à morte celular. Para mensurar a extensão desses danos, a avaliação de viabilidade celular é um método no qual aplica marcadores fluorescentes como o diacetato de fluoresceína (FDA), o SYBR-14 e o iodeto de propídio (PI).

Este protocolo utiliza um método fluorimétrico rápido para avaliação da viabilidade celular, simultaneamente aplicando corantes de inclusão (FDA) e exclusão (PI). O FDA é um éster apolar, que tem a capacidade de permear as membranas plasmáticas, passando pelo processo de hidrólise promovido por esterases intracelulares, e que por fim, resulta na produção de fluoresceína livre. O SYBR-14 é um corante lipossolúvel, que possui afinidade pelo DNA, e ao penetrar nas células perde seu grupo acil, ligando-se à fita dupla de DNA das células vivas (Garner; Johnson, 1995; Bergstein; Bicudo, 2014). Diferentemente, o PI não possui a capacidade de permear uma membrana celular viável, e como resultado deste processo, as células viáveis são coradas de verde brilhante com FDA e SYBR-14, e as células não viáveis são coradas de vermelho brilhante com PI.

O ensaio MTT é um teste de alta precisão, que avalia a atividade mitocondrial das células, em que a mitocôndria reduz o MTT em cristais de formazan, resultando em uma coloração roxa, pela ação da enzima desidrogenase succínica (Shokrgozar *et al.*, 2007). Quanto maior a quantidade de células viáveis resultantes, maior a produção de cristais de formazan, que se dissolvem e são captados pelo espectrofotômetro. O ensaio avalia essa atividade mitocondrial, com base nos valores de absorvância, correlacionados com o número de células vivas.

A análise da morfologia espermática é amplamente utilizada para avaliar o percentual morfológico de células normais e anormais, considerando os tipos de patologias e anormalidades. Estas anormalidades podem estar relacionadas a fatores

genéticos, ou até mesmo com fatores ambientais e de manejo da amostra (Miliorini *et al.*, 2011).

A motilidade espermática é um parâmetro utilizado para a avaliação da qualidade espermática, e para reduzir a subjetividade da análise, utiliza-se os softwares para a avaliação dos parâmetros de motilidade e velocidade dos espermatozoides.

## 2.2 Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo biológico

O zebrafish (*Danio rerio*) é um teleósteo tropical de água doce, da família Cyprinidae. Caracterizado por seu tamanho diminuto, pode atingir em torno de 4-5 cm de comprimento (Spence *et al.*, 2008). Na natureza, é encontrado em cardumes de variados tamanhos: em águas lentas, em grupos pequenos de 6-7 peixes; em grupos de 22 peixes nas águas paradas e até de 300 peixes em águas de alto fluxo (Graham *et al.*, 2018). A espécie apresenta dimorfismo sexual (Figura 1), caracterizada pelas diferenças na coloração, que se iniciam após seis semanas de vida (Darrow; Harris, 2004). Os machos apresentam o corpo mais afilado e geralmente dourados na região ventral, já as fêmeas são mais prateadas e arredondadas na região ventral, o que é mais evidente no período próximo da desova. As fêmeas apresentam após os quatro meses de idade, a papila genital transparente, macia e proeminente, cobrindo a abertura urogenital, uma característica mais precisa para diferenciação sexual (Yossa *et al.*, 2013).



**Figura 1** . Dimorfismo sexual em zebrafish (*Danio rerio*). **A)** Macho; **B)** Fêmea. Fonte: Marques, 2015.

A fertilização e desenvolvimento são externos, sendo assim considerados animais ovulíparos. A idade reprodutiva da espécie inicia-se aos quatro meses após a fertilização até aos três anos de idade, contudo, com o avanço da idade, sua capacidade de reprodução diminui drasticamente, portanto, recomenda-se que se realize as reproduções com animais de idades entre 6 e 18 meses (Nasiadka; Clark, 2012).

As fêmeas de zebrafish podem desovar a cada 2-3 dias, e em cada desova pode conter centenas de oócitos (Lawrance, 2007), porém é recomendado que a frequência adequada de desova seja uma vez por semana, para garantir um rendimento máximo de oócitos e eficiência de fertilização (Kurtzman *et al.*, 2010). Em seu habitat natural, o zebrafish apresenta estação reprodutiva entre abril e agosto, presumivelmente variando um pouco pela altitude e condições climáticas, sendo que a colocação dos ovos ocorre em pequenas áreas alagadas adjacentes a córregos (Engeszer *et al.*, 2007).

O zebrafish apresenta características que favorecem a sua escolha como modelo experimental, como por exemplo, a alta fecundidade, pequeno tamanho, o rápido tempo entre gerações, transparência óptica durante a embriogênese e homologia genética com humanos (Lawrance, 2007); custo de criação e manutenção é inferior à de outros animais utilizados na pesquisa, como os camundongos.

Com a extensa homologia de seu genoma com o de outras espécies de vertebrados, como os humanos, que apresentam cerca de 70% dos genes em comum com o zebrafish (Howe *et al.*, 2013), a espécie tornou-se um organismo popular no estudo de genética, biologia do desenvolvimento e biomedicina (Kalueff *et al.*, 2014). O zebrafish vem sendo o modelo utilizado em pesquisas com vários compostos, testes de segurança com fármacos, avaliação de riscos ambientais e toxicidade durante o desenvolvimento (Ali *et al.*, 2014). Há um interesse crescente na utilização do zebrafish como organismo modelo para pesquisas comportamentais e/ou farmacológicas, pois seu comportamento é influenciado por manipulações ambientais e farmacológicas, podendo ser estudado baseando-se no comportamento exploratório, e nas respostas do sistema endócrino ao estresse (Cachat *et al.*, 2009).

O uso desta espécie como modelo animal neste projeto, se justifica por ser de pequeno porte, fácil manutenção, econômicos para criação, completa sua embriogênese em 72 h e o intervalo entre gerações é curto.

### **2.2.1 Estrutura ovariana de zebrafish (*Danio Rerio*)**

O zebrafish pode ser induzido a se reproduzir naturalmente durante todo o ano, em laboratório, com uma produção de 200-300 ovos de forma regular e semanal. Por compartilhar características comuns com mamíferos, o zebrafish possui o sistema de regulação ovariana semelhante aos humanos (Li; Ge, 2020).

Os ovários possuem função endócrina e garantem o desenvolvimento dos folículos, promovendo a ovulação dos oócitos capacitados à fecundação. Em peixes teleósteos, os ovários são classificados conforme os padrões de desenvolvimento folicular, podendo ser denominados como sincrônicos, grupos sincrônicos e assincrônicos (Wallace; Selman, 1981). Em ovários do tipo sincrônico, o crescimento, a maturação e ovulação dos folículos ocorrem de forma simultânea; ovários do tipo grupo sincrônico, se caracterizam por terem ao menos duas populações de oócitos em distintas fases de desenvolvimento; já os ovários assincrônicos se caracterizam por apresentarem folículos em distintas fases de desenvolvimento, e são liberados conforme amadurecem. As fêmeas adultas de zebrafish apresentam ovários do tipo assíncronos, contendo folículos ovarianos de todos os estágios de desenvolvimento. O desenvolvimento ovariano refere-se ao processo pelo qual as células germinativas primordiais (PGCs) tornam-se óvulos para fertilização (Lubzens *et al.*, 2010; Li; Ge, 2020).

### **2.2.2 Desenvolvimento de oócitos em zebrafish**

No início do desenvolvimento embrionário inicial, as células germinativas derivadas do plasma germinativo são especificadas para se tornar PGCs, e então ocorre a proliferação e migração das PGCs para a área onde futuramente serão desenvolvidas as gônadas (Paksa; Raz, 2015; Raz, 2003, Li; Ge, 2020). A oogênese ocorre em todos os indivíduos, independentemente de qual será seu sexo futuramente, enquanto a atual diferenciação sexual começa tardiamente no desenvolvimento gonadal. Durante a diferenciação sexual, ocorre a degeneração dos

oócitos imaturos por apoptose, em animais que provavelmente serão machos, e em contrapartida, a oogênese prossegue até o fim nas possíveis fêmeas (Takahashi,1977; Li; Ge, 2020).

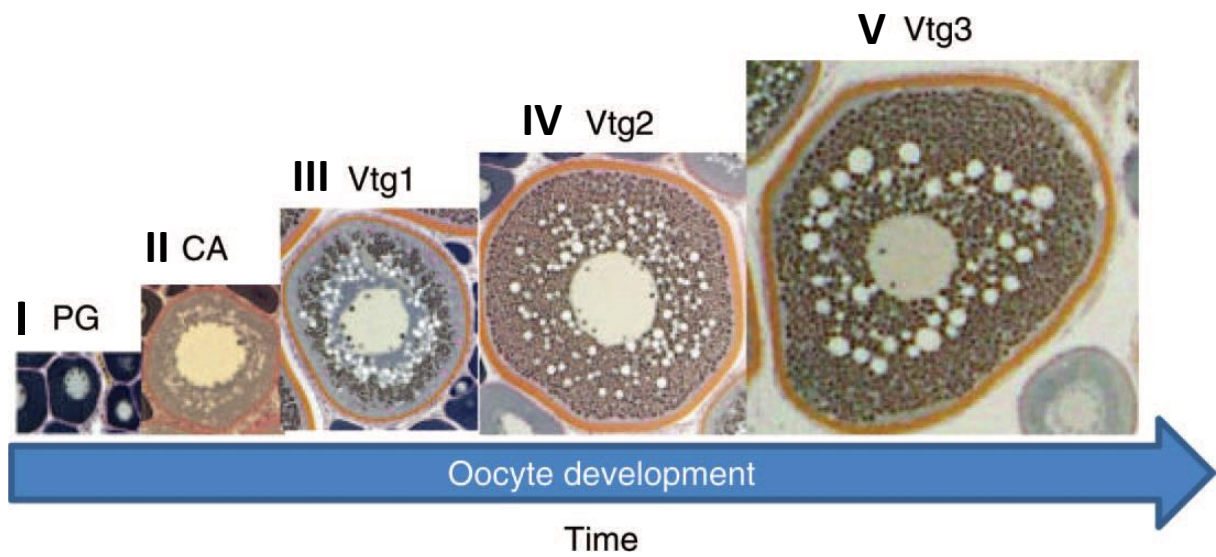
Após a migração das PGCs para o alvo, estas se unem com as células somáticas gonadais em torno de 5 dias pós fertilização (dpf) e posteriormente se diferenciam em oogônias. (Leerberg et al. 2017, Li; Ge, 2020). Estas oogônias proliferam dentro dos cistos por mitose, antes de sofrer meiose, para finalmente se tornarem oócitos.

De acordo com Selman *et al.* (1993), os oócitos se classificam em cinco estádios de acordo com a estrutura celular, morfologia e processos bioquímicos (Figura 2). O estágio I, ou estágio de crescimento primário (CP), divide-se em fase IA (pré folicular - diâmetro entre 7 e 20  $\mu\text{m}$ ) e IB (folicular - diâmetro entre 20 e 140  $\mu\text{m}$ ). Na fase IA ou pré folicular (encontrado em torno de 13 dpf), os oócitos encontram-se inseridos em cistos com muitos nucléolos (Li; Ge, 2020). Dentro da fase IB ou folicular (encontrado em torno dos 21 dpf), ocorrem a migração dos nucléolos para a periferia do núcleo, formando oócitos perinucleolares circundados por uma única camada de células foliculares. No estágio II, conhecido também por fase alvéolo cortical (CA; 140–340  $\mu\text{m}$  de diâmetro; encontrado em torno de 45 dpf, envolve a transcrição ativa de genes e inicia-se a formação do envelope vitelínico.

O estágio III ou Vitelogênese (340–690  $\mu\text{m}$  de diâmetro; 60 dpf) é o período no qual os oócitos crescem rapidamente devido ao acúmulo de vitelo no citoplasma. Dentro do estágio vitelogênico, existem três fases: Vitelogênico Primário (Vgt1), Vitelogênico Secundário (Vgt2) e Vitelogênico Terciário (Vgt3).

No estágio Vgt1, os oócitos possuem grânulos de vitelo nas adjacências do oócito e pelo núcleo, juntamente com gotículas de lipídeo; nos oócitos Vgt2, esses grânulos de vitelo aparecem espalhados pelo citoplasma juntamente com as gotas de lipídeo; e por fim, no estágio Vgt3 os oócitos se apresentam praticamente completo de vitelo no citoplasma, e com o núcleo envolto pelas gotas de lipídeo (Matsuyama *et al.* 1990; Murua *et al.* 1998; Hiramatsu *et al.* 2015).

Na fase de maturação (690-730  $\mu\text{m}$  de diâmetro), ocorre a clivagem de proteínas e quebra da vesícula germinativa, tornando os oócitos translúcidos, seguida pela liberação do primeiro corpúsculo polar. Na última fase, ocorre a liberação dos oócitos maduros de dentro dos folículos para o lúmen do ovário, já aptos para a fertilização (Li; Ge, 2020).

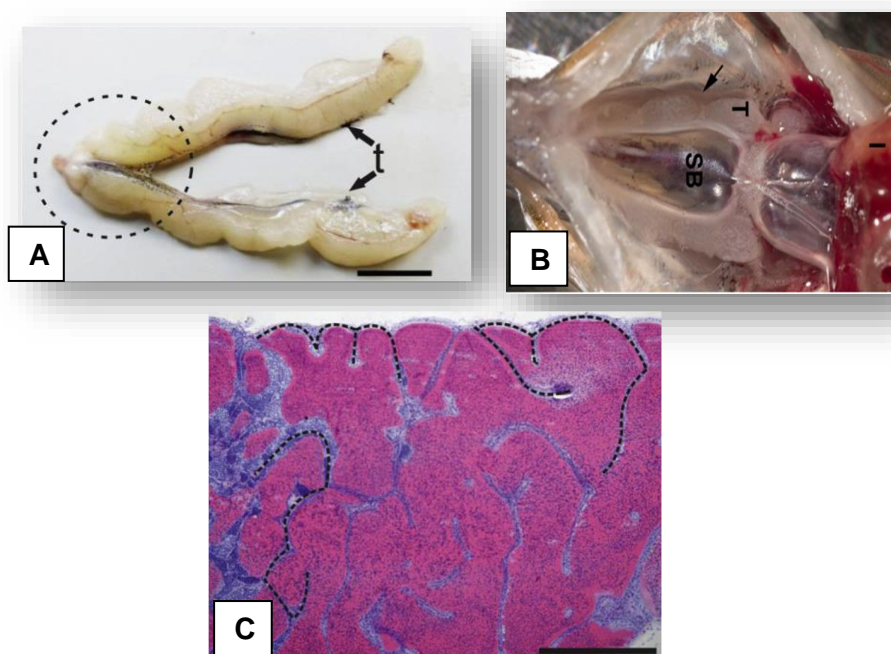


**Figura 2.** Desenvolvimento oocitário em truta marinha pintada (*Cynoscion nebulosus*). **(I)** PG: Crescimento primário Alvéolo Cortical (CA); **(III)** Vitelogênico Primário (Vtg1); **(IV)** Vitelogênico secundário (Vtg2); **(V)** Vitelogênico terciário (Vtg3). Fonte: Adaptado de Lowerre-Barbieri *et al.*, 2011

### 2.3 Estrutura testicular de zebrafish (*Danio rerio*)

Os testículos dos peixes são geralmente órgãos em pares (Figura 3A), caracterizados por serem alongados e presos à parede dorsal do corpo, por uma bainha fibrosa de tecido conjuntivo chamada mesórquio. Na cavidade celomática, os testículos estão localizados ventralmente à bexiga natatória e dorsalmente ao intestino (Figura 3B). O ducto testicular surge da superfície meso/dorsal de cada testículo, e continua no ducto espermático formando um segmento curto e não pareado antes de se abrir na papila urogenital.

Os ductos espermáticos formam o sistema de ductos testiculares, que realizam o transporte dos espermatozoides e que estão relacionadas ao armazenamento, nutrição e reabsorção dos espermatozoides, na secreção do fluido seminal e na indução da motilidade dos espermatozoides, alterando a composição iônica do fluido seminal (Schulz; Nóbrega, 2011). Anatomicamente, os testículos do zebrafish são classificados como tubular anastomasado (Maack; Segner, 2003), que se caracteriza por apresentar compartimentos germinativos interconectados ao longo do testículo (Grier, 1993) (Figura 3C).



**Figura 3. A)** Testículos alongados e pareados (Anatomia do testículo *Astyanax altiparanae*; Siqueira-Silva *et al.*, 2019); **B)** Testículos pareados (esq. e dir.) em zebrafish (*Danio rerio*) (T), localizados ventralmente à bexiga natatória (SB) e dorsalmente ao intestino (I) (Qian *et al.*, 2022); **C)** Testículos do tipo tubular anastomasados em *Astyanax altiparanae* (Siqueira-Silva *et al.*, 2019)



### 2.3.1 Espermatogênese em zebrafish (*Danio rerio*)

A espermatogênese é um processo importante onde ocorre a formação de espermatozoides através da meiose I e II, que envolve uma sequência de tipos de células, como espermatogônias-tronco (SSC), espermatócitos derivados de SSCs por divisão celular mitótica, espermatídes haplóides por meiose e as células somáticas de suporte, tais como as células de Leydig e de Sertoli (Nishimura; L'Hernault, 2017, Qian *et al.*, 2022). É um complexo processo em que espermatogônias diploides produzem milhões de espermatozoides diariamente, sustentado por células-tronco, com potencial de autorrenovação e diferenciação em espermatogônias ligadas ao desenvolvimento espermático (Schulz; Nóbrega, 2011). Em alguns peixes, a espermatogênese segue em um padrão cístico, com a formação de cistos que se constituem quando uma única espermatogônia do tipo A, que é completamente circundada pelas projeções citoplasmáticas de uma ou duas células de Sertoli (Pudney, 1993).

Em zebrafish, as espermatogônias foram descritas e classificadas como tipo A indiferenciada (Aund.\*), tipo A indiferenciada (Aund.), tipo A diferenciada (Adif.) e espermatogônia tipo B inicial e final. Estas classificações foram estabelecidas de acordo com a forma nuclear, condensação da cromatina, quantidade de nucléolos e tamanho celular (Leal *et al.*, 2009; Rodrigues *et.al*, 2015).

As espermatogônias do tipo A indiferenciada (Aund.\*) e A indiferenciada (Aund.), podem ser diferenciadas em testículos de zebrafish de acordo com critérios morfológicos. Estas são as maiores células germinativas, com grande núcleo, cromatina pouco condensada. Se diferenciam entre si pelo envelope nuclear com contorno irregular encontrado em Aund.\*, ao contrário das espermatogônias do tipo Aund. As do tipo A diferenciadas (Adiff) são muito semelhantes às do tipo indiferenciado. No entanto, por serem células resultantes de mitoses com citocinese incompleta, elas se agrupam dentro do cisto, e são menores que as espermatogônias do tipo Aund. Apresentam um núcleo mais denso, porém menor, onde o envelope nuclear possui forma arredondada e regular.

Em espermatogônias do tipo B iniciais, apresentam um núcleo alongado/redondo, com um ou dois pequenos nucléolos. Difere-se das espermatogônias tipo A, pois apresentam um aumento da quantidade de

heterocromatina. Na do tipo B tardia, o número de células germinativas dentro do cisto aumenta, o núcleo é redondo e denso, e a heterocromatina atinge sua máxima densidade (Leal *et.al*, 2009).

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar oócitos e espermatozoides de zebrafish, coletados em diferentes estágios do processo de *rigor mortis*, para futuro desenvolvimento de protocolo de criopreservação de gametas de reprodutores em cativeiro ou de animais selvagens que venham a óbito ou mesmo encontrados mortos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os efeitos dos índices de *rigor mortis* (fresco/controle, pré-*rigor mortis*, *rigor mortis*, *post rigor*) em oócitos, avaliando viabilidade celular e atividade mitocondrial;
- Avaliar os efeitos dos índices de *rigor mortis* (fresco/controle, pré-*rigor mortis*, *rigor mortis*, *post rigor*) na viabilidade espermática, avaliando viabilidade celular, atividade mitocondrial, motilidade e morfologia dos espermatozoides.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Controle ambiental e cuidados com os animais

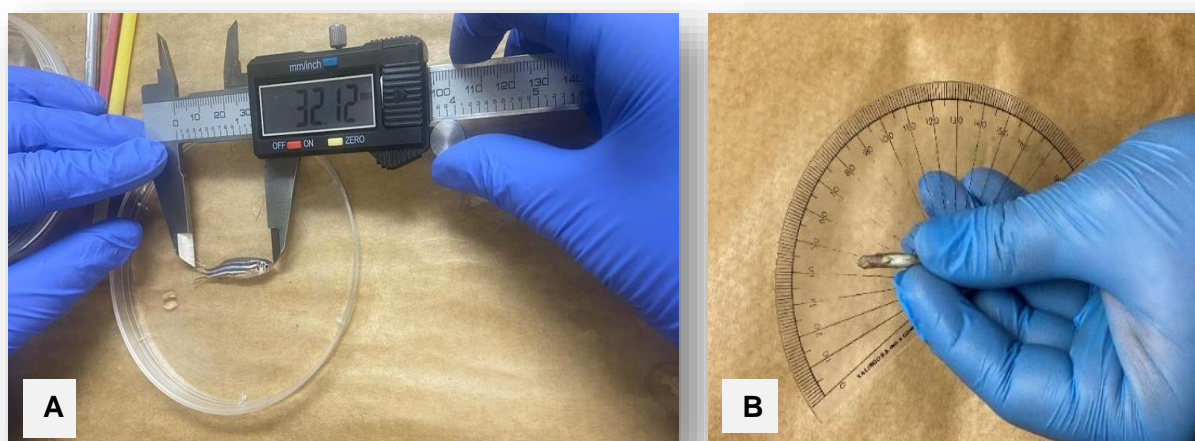
Os zebrafish (*Danio rerio*) foram aclimatados por duas semanas em aquários de 40 L, em densidade de estoque > 7 peixes/L, com água filtrada, desclorada, aeração constante e temperatura  $27^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH entre 7,0 e 7,4 e fotoperíodo de 14/10 h dia/noite, no Laboratório de Aquicultura. Todos os parâmetros para a manutenção de um ambiente ideal para os peixes foram periodicamente verificados, tais como pH, temperatura, alcalinidade, amônia, nitrito e oxigênio dissolvido, de acordo com Westerfield (2000). A alimentação dos peixes foi realizada três vezes ao dia, com ração comercial micro extrusada, com nível de proteína de 45% e granulometria 0,8mm. Para a realização do experimento, os animais foram submetidos ao jejum de 24h até o momento da eutanásia, a fim de evitar contaminação no momento da coleta dos tecidos.

Para obtenção dos tecidos ovariano e testicular, os animais foram eutanasiados por meio de imersão em dose letal de triclaína metano sulfonato (0,6 mg/mL;  $27^{\circ}\text{C}\pm 0,5$ ; pH 7,0 a 7,4) (Matthews; Varga, 2012; Resolução normativa 37 CONCEA). A duração do banho anestésico ocorreu até o momento da perda do tônus muscular, imobilidade e redução dos movimentos operculares. A categoria de severidade definida foi *sem recuperação*, pois o procedimento foi conduzido sob anestesia geral, na qual o animal não recupera a consciência (Treves-Brown, 2000; American Veterinary Medical Association, 2020).

O estudo foi conduzido de acordo com o Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal - CONCEA e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Número do projeto: 43232.

## 4.2 Índice de rigor mortis em zebrafish (*Danio rerio*)

Após a eutanásia, peso e comprimento total de cada animal foi registrado, com o auxílio de uma balança digital de precisão e de um paquímetro digital, respectivamente. Em intervalos de 30 min a uma hora após a morte, cada animal foi sustentado pelo pedúnculo caudal e medido com um transferidor (180°) para aferição do ângulo (Figura 4B), de acordo com a referência de Dunford *et al.* (2019), para determinar o estágio do *rigor mortis* conforme a nomenclatura e angulação (Tabela 1).



**Figura 4. A)** Avaliação biométrica em zebrafish com paquímetro digital; **B)** Avaliação do índice de rigor. Fonte: Autor (2022).

Os animais atingiram os índices de *rigor mortis*, de acordo com a temperatura e umidade do ambiente no momento de cada análise (média de temperatura e umidade  $21,5 \pm 2,12$  °C /  $66 \pm 6,3\%$ ), respectivamente. Conforme os animais atingiram a angulação no transferidor, correspondendo ao índice de rigor estabelecido, realizou-se a coleta.

As gônadas foram coletadas para as análises de acordo com o índice de *rigor mortis* (Tabela 1). A avaliação completa, desde a biometria à mensuração da angulação no transferidor, foi realizada para machos e fêmeas, e em todos os tratamentos. Todos os animais permaneceram em placas de petri (Figura 5), com a adição de uma lâmina de água do sistema dos aquários, a fim de evitar o ressecamento do animal.

**Tabela 1.** Relação dos tratamentos e ângulos para determinação do estágio de rigor mortis em fêmeas e machos de zebrafish.

<b>Tratamento</b>	<b>Angulação (°)</b>
<i>Fresco (Controle)</i>	40°
<i>Pré-rigor mortis</i>	35°
<i>Rigor mortis (rigor pleno)</i>	0°
<i>Post rigor</i>	40°



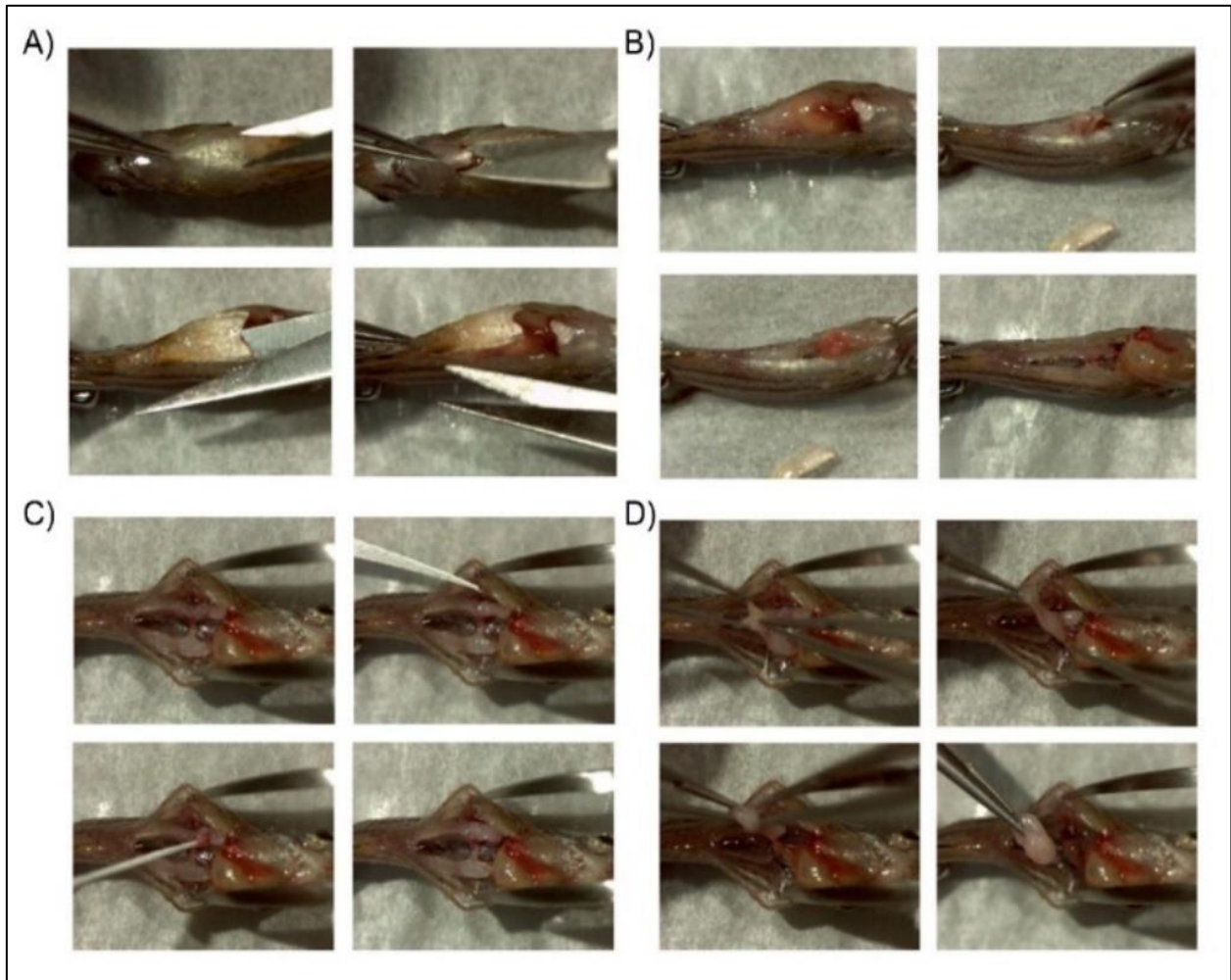
**Figura 5.** Zebrafish em placa de petri. Fonte: Autor (2022).

### 4.3 Coleta de tecidos ovarianos e testiculares

Os tecidos ovarianos e testiculares foram coletados logo após eutanásia (fresco/controle), nos estágios de pré-*rigor mortis* (início do enrijecimento muscular), rigor pleno (*rigor mortis* estabelecido, ângulo de zero graus) e *post rigor* (quando ocorrer perda da rigidez muscular), de acordo com o tempo necessário para atingir as angulações no transferidor.

#### 4.3.1 Fêmeas

Após a eutanásia e de acordo com o estágio de *rigor mortis*, sob a ocular de um microscópio estereoscópio, os animais foram posicionados em decúbito dorsal com o auxílio de uma pequena pinça pressionando o pedúnculo caudal. Usando uma pequena pinça serrilhada e uma tesoura de microdissecção, foi feita uma pequena incisão na superfície ventral do abdômen de cada animal, em sentido cranial (Figura 6). A inserção da ponta da tesoura era feita logo abaixo da parede do corpo, realizando dois cortes superficiais, circundando a abertura urogenital e as nadadeiras pélvicas (Figura 6A). Removia-se cuidadosamente a aba de tecido criada com o corte, com a finalidade de evitar o rompimento dos tecidos internos. O intestino distal foi puxado na direção cranial, expondo os ovários (FIGURA 6B). O surgimento de sangue ou fluido na cavidade corporal foi cuidadosamente removido por absorção, com um lenço de papel (Figura 6C). Com a ponta de uma pinça fina, os ovários foram removidos (Figura 6D).



**Figura 6.** Coleta de testículos e ovários em zebrafish. **A)** Incisão e cortes superficiais; **B)** Retirada do trato gastrointestinal para exposição dos ovários e testículos; **C)** Exposição dos tecidos ovarianos e testiculares, para remoção; **D)** Remoção dos tecidos. Fonte: Matthews; Carmichael (2015).



Os ovários foram colocados diretamente em placas de Petri, contendo meio Leibovitz (L-15) (Sigma) 90% com pH ajustado para 9 (Figura 7), e logo após, foram pesados. Após a pesagem, os ovários foram fragmentados em três pedaços, com dimensões de aproximadamente 10 x 2 mm, cuidadosamente dissecados com agulhas descartáveis 26G e pesados individualmente. A coleta do tecido foi realizada em no máximo 20 min à temperatura ambiente.



**Figura 7.** Ovários de zebrafish em solução de L-15 (Leibovitz) 90%, pH 9. Fonte: Autor (2022).

#### 4.3.2 Machos

A coleta do tecido testicular foi realizada com a aplicação do mesmo protocolo de retirada, descrito e utilizado para as fêmeas. Os testículos foram identificados como um tecido branco linear bilateral, imediatamente ventral à bexiga natatória. Com a ponta de uma pinça fina, os testículos foram removidos, e em seguida pesados e colocados em tubos tipo eppendorf (volume 1,5 ml), contendo solução salina balanceada de Hank (HBSS). Por esmagamento das gônadas, extraíam-se os espermatozoides (Yang *et al.*, 2007).

## 5 DESENHO EXPERIMENTAL

No experimento realizado com as fêmeas, foram realizadas as análises de atividade mitocondrial (MTT) e viabilidade celular (Live/Dead); 40 animais foram utilizados para análises de atividade mitocondrial (MTT) e 40 para análise de viabilidade celular, totalizando 80 fêmeas. Após a eutanásia, os animais foram pesados e medidos (peso médio:  $0,585\text{g} \pm 0,181\text{ g}$ ; comprimento médio:  $3,64 \pm 0,503\text{ cm}$ ), de acordo com o índice de *rigor mortis*. O tecido ovariano foi extraído e transferido para meio Leibovitz (L-15) (Sigma) 90%, com pH ajustado para 9, e logo após, pesado (peso médio dos ovários  $0,071 \pm 0,034\text{ g}$ ). Os ovários foram fragmentados em três pedaços (peso médio dos fragmentos  $0,023 \pm 0,010\text{ g}$ ), com dimensão de 10 x 2 mm, cuidadosamente dissecados dos ovários com agulhas descartáveis 26G e pesados individualmente. Essa etapa foi executada em no máximo 20 minutos em temperatura ambiente (média de temperatura  $21,5 \pm 2,12\text{ }^\circ\text{C}$ ; umidade  $66 \pm 6,3\%$ ). Cada fragmento ovariano foi colocado em tubos do tipo eppendorf contendo solução L-15 90% (400  $\mu\text{L}$ ).

Quarenta machos de zebrafish foram utilizados para as análises de atividade mitocondrial (MTT) e morfologia espermática; 40 para análise de viabilidade celular (Live/Dead), e 40 animais para a análise de motilidade espermática, somando 120 animais machos no total. Para a coleta das amostras de sêmen, os peixes foram eutanasiados por imersão em tricáína, em seguida pesados e medidos (peso médio  $0,449 \pm 0,130\text{ g}$ ; comprimento médio  $3,639 \pm 0,385\text{ cm}$ ), e posteriormente coletou-se o tecido testicular, de acordo com o índice de *rigor mortis*. Os testículos foram pesados (peso médio  $0,011 \pm 0,017\text{ g}$ ), e em seguida, esmagados dentro de tubos do tipo eppendorf, contendo HBSS (50  $\mu\text{L}$ ). (Figura 8).



**Figura 8.** Desenho experimental ilustrando experimentos realizados com o modelo experimental zebrafish.

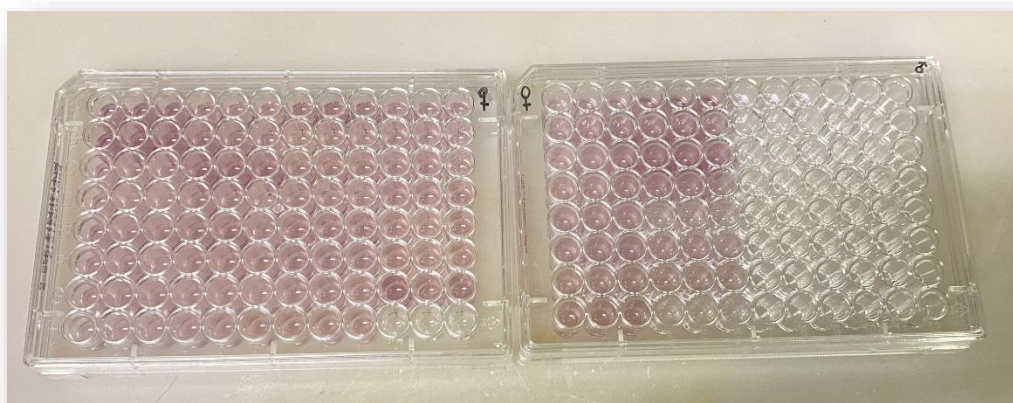
## 6 ANÁLISES DE VALIDAÇÃO

### 6.1 Ensaio MTT – Atividade Mitocondrial

Os fragmentos de tecido ovariano foram hidratados em L-15 90% (400  $\mu$ L), e logo após, o líquido foi retirado. As amostras foram incubadas com solução de MTT (400  $\mu$ L) por 120 min a 28°C.

O sêmen foi homogeneizado em solução de HBSS (50  $\mu$ L) e centrifugado a 1000 G por 10 min (Centrífuga Refrigerada NT 815). O sobrenadante da amostra centrifugada foi cuidadosamente descartado, e a amostra incubada em solução de MTT (400  $\mu$ L) por 120 min a 28°C.

Os cristais foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (Me<sub>2</sub>SO) (400 µL), e o protocolo foi adaptado adicionando paraformaldeído 14% (20 µL), atuando como um fixador, e congelando a amostra a 4°C até o seguinte dia, para medição em leitor de microplacas. Essa adaptação justifica-se pelo horário do último tratamento (*post rigor*) e pela ausência de leitor de microplacas disponível no momento da análise. O protocolo de adaptação foi padronizado para todas as amostras. No dia seguinte, as amostras foram descongeladas e pipetadas para microplaca de 96 poços em triplicata (100 µL em cada poço) (Figura 9), e a absorbância foi lida a 570nm em um leitor de microplacas SpectraMax® M2. O protocolo foi aplicado para as amostras de de fragmentos ovarianos e sêmen.



**Figura 9.** Ensaio MTT - Placas de 96 poços com amostras, para leitura em leitor de microplacas.  
Fonte: Autor (2022).

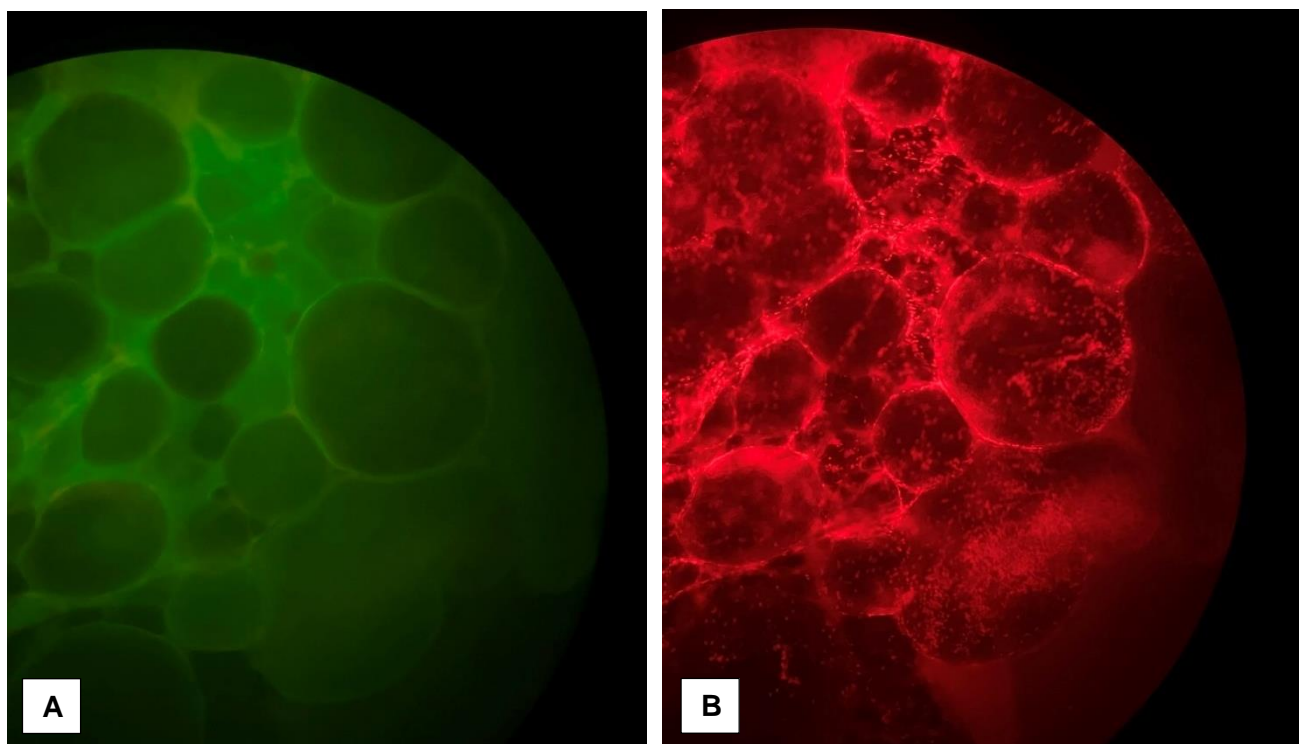
## 6.2 Viabilidade celular – Oócitos e espermatozoides - Live/Dead

Para a análise de fragmentos de tecido ovariano, foram utilizados o diacetato de fluoresceína (FDA) e iodeto de propídio (IP). Um fragmento de tecido ovariano de cada fêmea (10 animais de cada tratamento), foi incubado em de FDA (0,02 mg/mL; 300 µL) e IP (0,2 mg/mL; 30 µL), ao abrigo da luz por 4-5 min à temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Em seguida, o fragmento de tecido a ser analisado foi colocado na lâmina para análise em microscópio, e fotografados para posterior contabilização das células viáveis e não viáveis, nos diferentes estágios oocitários (crescimento primário – PG; alveolar cortical – CA; Vitelogênico primário- Vtg1; Vitelogênico secundário- Vtg2;

Vitelogênico terciário – Vtg3). Os ensaios de viabilidade usando FDA com IP foram realizados de acordo com o método descrito por Jones e Senft (1985) (Figura 10).

Para o ensaio de viabilidade celular dos espermatozoides, uma alíquota de sêmen previamente diluídos e macerados em solução HBSS (Hank) (20  $\mu$ L), de cada macho e cada tratamento (10 animais de cada tratamento: fresco/controle; *pré-rigor mortis*; *rigor mortis* e *post rigor*, total de 40 amostras), foi incubada em SYBR-14 (0,02 mm; 300  $\mu$ L) por 4 minutos, e em IP (1,19 mm; 0,5  $\mu$ L), ao abrigo da luz por 1 min à temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Após incubação, as amostras foram colocadas em lâminas, para análise em microscópio, e fotografados para posterior contabilização das células viáveis e não viáveis.

Todas as análises do ensaio de viabilidade celular (fêmeas e machos) foram executadas em microscópio invertido de fluorescência Option, em aumento de 10X vezes (fêmeas) e 20Xvezes (machos).



**Figura 10.** Avaliação de viabilidade celular (LIVE/DEAD) de oócitos, em diferentes estádios de desenvolvimento, em zebrafish (*Danio rerio*). **A)** Células coradas com marcador fluorescente FDA, indicando as células viáveis; **B)** Células coradas com marcador fluorescente iodeto de propídio (IP), indicando as células não-viáveis. Fonte: Autor (2022).

### 6.3 Análise espermática assistida por computador (CASA)

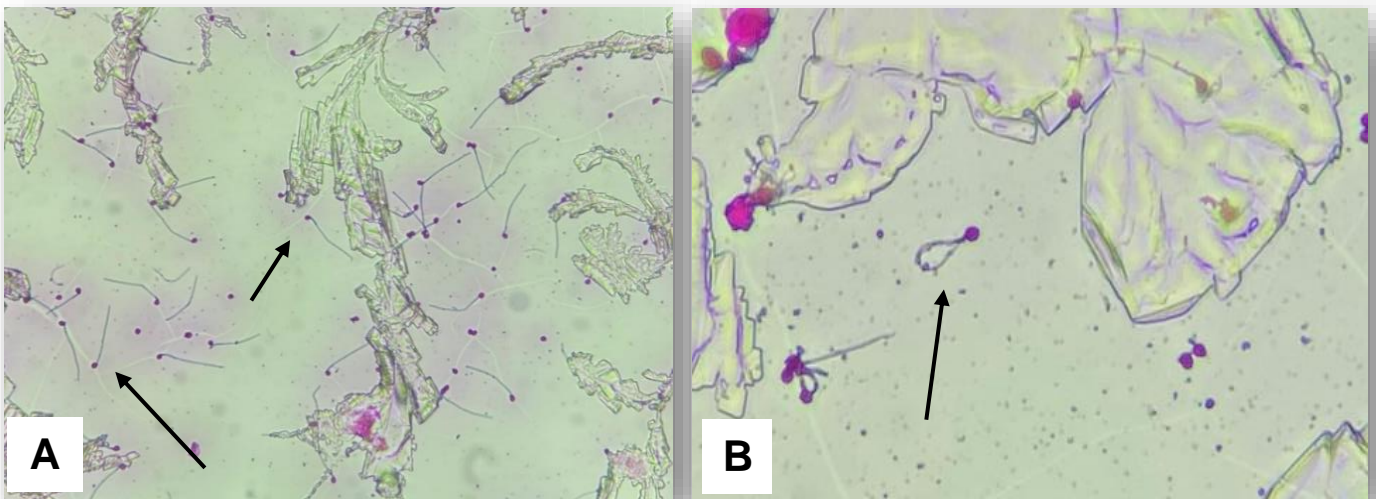
Foram analisadas amostras de sêmen coletadas frescas, e nos três períodos do processo de *rigor mortis* (*pré-rigor mortis*, *rigor mortis*, *post rigor*), avaliando os tempos de motilidade, duração do movimento e a proporção de células móveis. Para a avaliação da cinética espermática, os espermatozoides, previamente extraídos das gônadas diretamente em HBSS (50 $\mu$ l; pH: 7,5; Osmolaridade 300 mOsm/KgH<sub>2</sub>O), foram ativados em água destilada na proporção de 1:10  $\mu$ L. Imediatamente após a ativação, 5  $\mu$ L dessa solução foram colocados em câmara de hemocítmetro Neubauer, cobertos com lamínula. A câmara foi colocada sob um microscópio de luz transmitida (Nikon Eclipse E200), conectado a uma câmera de alta velocidade (Basler AC640–120uc, 120 fps, Ahrensburg, Alemanha), com ampliação de 100X. Em seguida, foram gravados cinco vídeos de cada peixe, utilizando o software Pylon Viewer 4 (Versão 4.1.0.3660 64-Bit; Basler, Ahrensburg, Alemanha) a uma taxa de captura de 100 quadros por segundo. A duração dos vídeos gravados foi de 20 segundos, e a análise foi realizada em um período de 0,5 segundos (50 quadros), 10 segundos após a ativação. Os vídeos foram editados no software VirtualDub e analisados no software ImageJ, por meio do plugin CASA. As configurações utilizadas foram a=5, b=60, c=50, d=8, e=5, f=10, g=15, h=5, i=1, j=25, k=5, l=10, m=80, n=80, o=50, p=60, q=100, r=431, s=0, t=0 (adaptado de Wilson-Leedy; Ingermann, 2007). Os parâmetros avaliados foram: taxa de motilidade (MOT, %) velocidade curvilínea (VCL,  $\mu$ m s<sup>-1</sup>), velocidade média de percurso (VAP,  $\mu$ m s<sup>-1</sup>), velocidade em linha reta (VSL,  $\mu$ m s<sup>-1</sup>), retilinearidade (STR, %), oscilação (WOB, %), progressão (PROG,  $\mu$ m) e frequência cruzada de batimento (BCF, Hz).

### 6.4 Morfologia Espermática

A avaliação da morfologia espermática foi realizada com amostras de sêmen adquiridas pela diluição dos testículos em HBSS, e posteriormente fixadas em solução tamponada de formaldeído (4%) (Hancock, 1957). Uma alíquota de 30  $\mu$ L de cada



amostra foi homogeneizada com 3  $\mu\text{L}$  do corante Rosa Bengala (Streit Jr. *et al.*, 2004). A metodologia adaptada inclui a conformação das lâminas por gota escorrida, depositando duas gotas de 15  $\mu\text{L}$  cada, sobre uma lâmina histológica. As lâminas foram lidas em microscópio óptico Nikon Eclipse Si, com objetiva de 100X, utilizando óleo de imersão. A morfologia avaliada foi: espermatozoides normais, cabeça degenerada, macrocefalia, microcefalia, cabeça solta, gota proximal, gota distal, cauda curta, cauda quebrada, cauda dobrada, cauda enrolada, cauda fortemente enrolada (adaptado de Herman, 1994). No total, 40 lâminas (10 amostras de cada tratamento – fresco/controle; *pré-rigor mortis*; *rigor mortis* e *post rigor*), foram avaliadas, contabilizando 200 espermatozoides por lâmina, em duplicata.



**Figura 11.** Lâminas coradas para morfologia espermática de zebrafish. **A)** Espermatozoides normais, cabeça soltas, cauda quebrada; **B)** Detalhe de espermatozoide com cauda dobrada. Fonte: Autor (2022).

## 7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram submetidos a teste de normalidade (Shapiro Wilk e/ou Kolmogorov Smirnov) e homogeneidade (Bartlett e/ou Levene). As variáveis que atenderam aos pressupostos foram analisadas por meio de análise de variância de uma via (One-Way ANOVA), e quando observado diferença significativa as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com nível de 5% de significância.

Para avaliação dos tipos de patologias espermáticas observadas nos diferentes estágios de rigor mortis, foi utilizado uma análise de variância de duas vias (Two-Way ANOVA), considerando os efeitos do tipo de patologia (cabeça, gota citoplasmática e cauda), o estágio de *rigor mortis* e a interação entre fatores. Quando observado efeito significativo entre um dos fatores, foi aplicado teste de média. As análises e confecção de gráficos foram realizadas utilizando o software estatísticos GraphPad Prism 7.0.

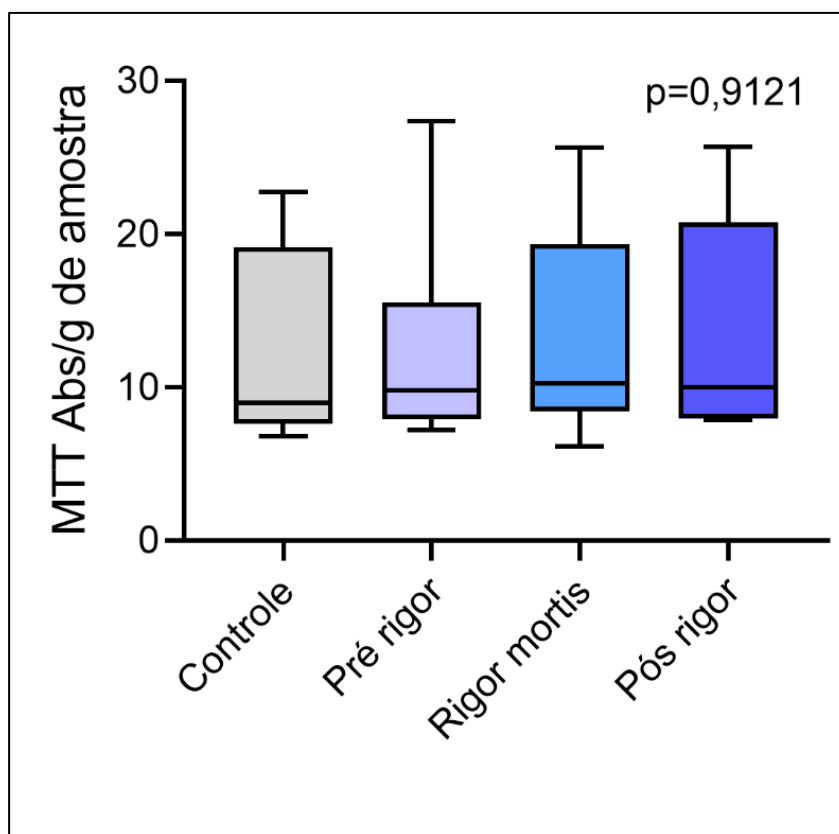
## 8 RESULTADOS

### 8.1 Fêmeas

#### 8.1.1 Atividade mitocondrial – Ensaio MTT

Na análise da atividade mitocondrial de oócitos de zebrafish coletados em diferentes estágios de *rigor mortis*, não houve diferença entre os grupos experimentais ( $p= 0,9121$ ) (Figura 12).



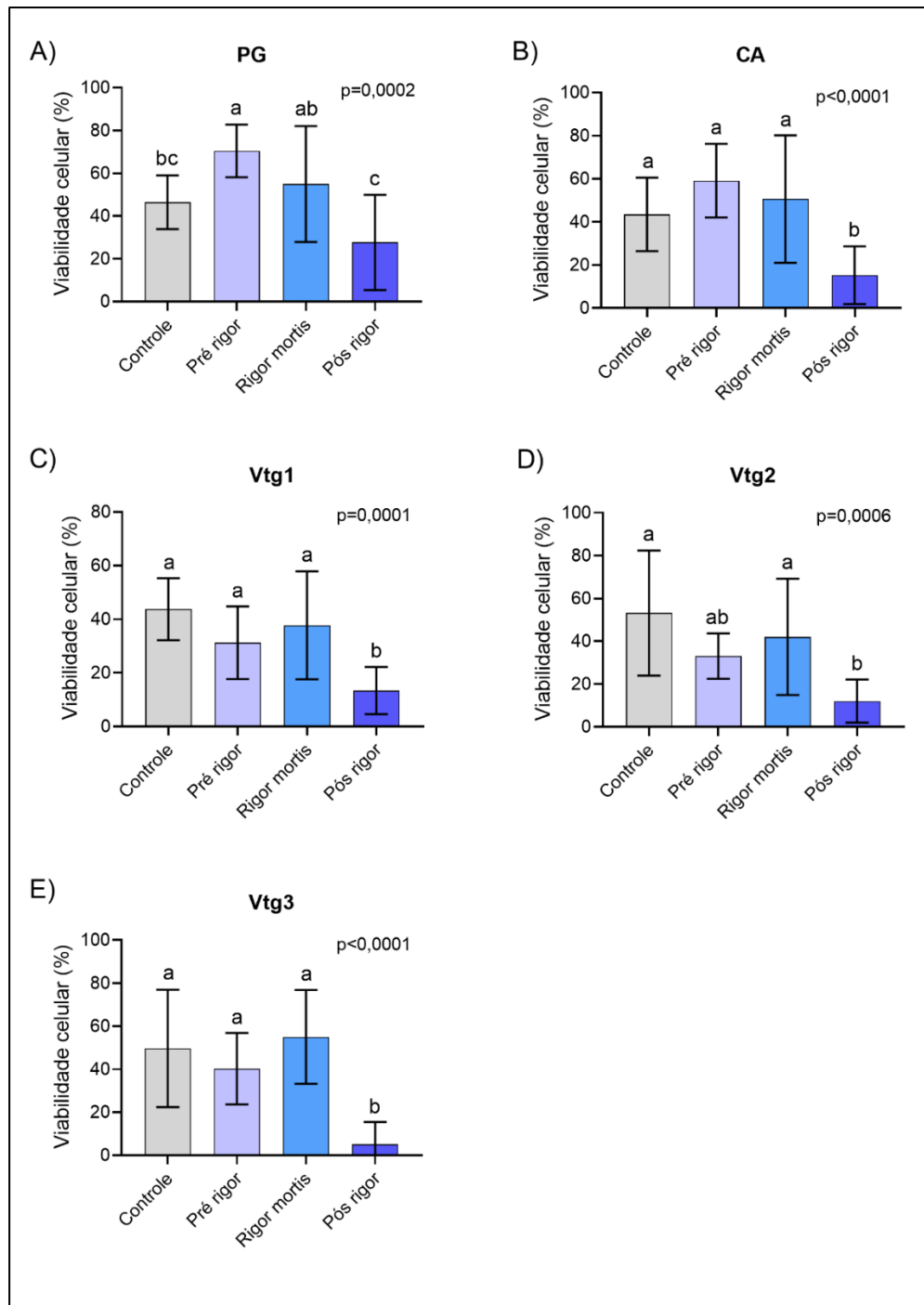


**Figura 12.** Atividade mitocondrial em fragmentos de tecido ovariano de zebrafish coletados em diferentes estágios de *rigor mortis*.

### 8.1.2 Viabilidade celular – Live/Dead

Para a avaliação de viabilidade celular, nos oócitos em estágio de crescimento primário (PG), o maior valor observado ( $P < 0,05$ ) foi no grupo *pré-rigor mortis* ( $70,43 \pm 12,31\%$ ), em relação ao grupo fresco/controle ( $46,43 \pm 12,54\%$ ) e *post rigor* ( $27,62 \pm 22,29\%$ ), e não diferindo ( $P > 0,05$ ) do grupo *rigor mortis* pleno. Quanto aos oócitos em estágio alvéolo cortical (CA), vitelogênico primário (Vtg1) e vitelogênico terciário (Vtg3), os maiores valores ( $P < 0,05$ ) de viabilidade celular foram observados nos grupos fresco/controle (CA:  $43,44 \pm 17,05\%$ ; Vtg1:  $43,75 \pm 11,54\%$ ; Vtg3:  $49,64 \pm 27,26\%$ ), *pré-rigor mortis* (CA:  $59,08 \pm 17,10\%$ ; Vtg1:  $31,24 \pm 13,57\%$ ; Vtg3:  $40,24 \pm 16,60\%$ ) e *rigor mortis* pleno (CA:  $50,99 \pm 29,57\%$ ; Vtg1:  $37,37 \pm 20,13\%$ ; Vtg3:  $54,98 \pm 21,84\%$ ), enquanto no grupo *post rigor* as médias foram para CA:  $15,22 \pm 13,44\%$ ; Vtg1:  $13,37 \pm 8,784\%$  e Vtg3:  $5,145 \pm 10,28\%$ .

Para os oócitos em estágio vitelogênico secundário (Vtg2), os maiores valores observados ( $P < 0,05$ ) foram nos grupos fresco/controlado ( $53,18 \pm 29,20\%$ ) e *rigor mortis* pleno ( $42,06 \pm 27,16\%$ ), enquanto no grupo *post rigor* a média ficou em  $12,04 \pm 10,06\%$ . De forma geral, observamos que os oócitos coletados em animais em estágio de *post rigor*, apresentaram o menor percentual de viabilidade celular.

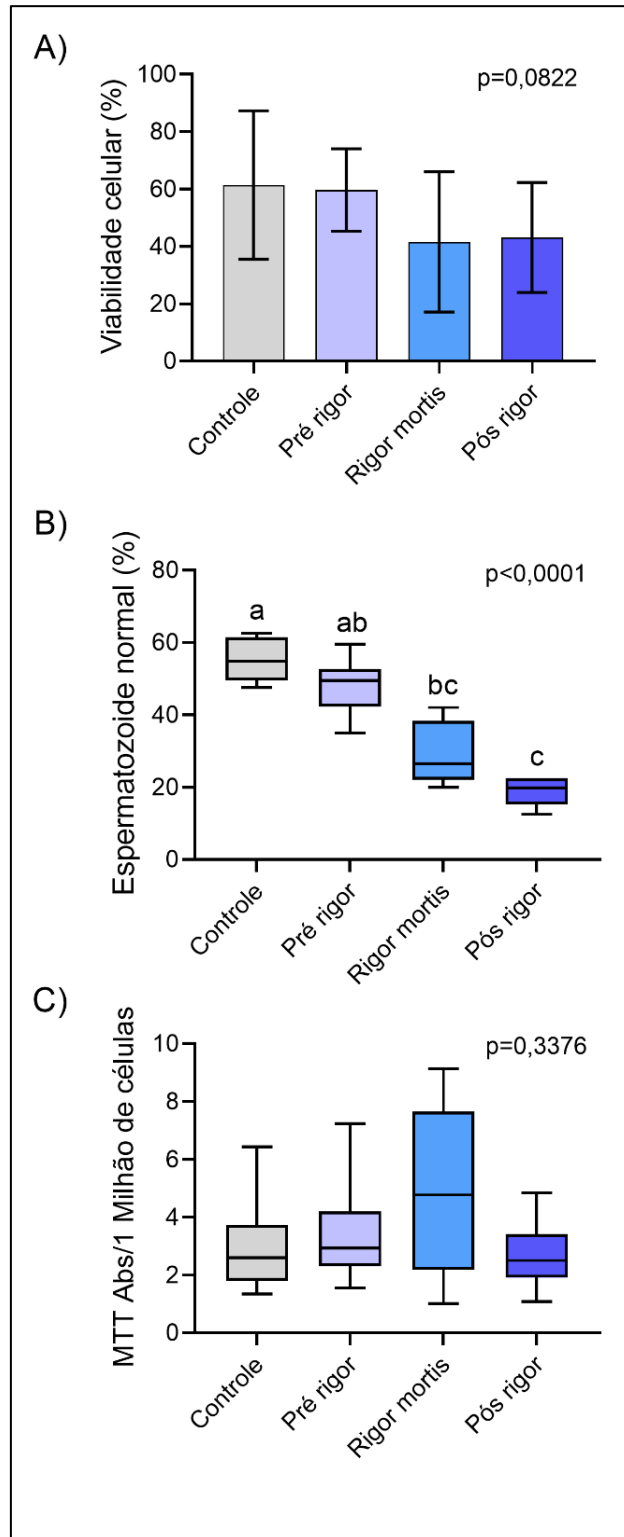


**Figura 13.** Viabilidade celular de oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento (PG; CA; Vtg1; Vtg2; Vtg3) de zebrafish coletados em diferentes estágios de *rigor mortis*. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os estágios de *rigor mortis* no mesmo nos oócitos no mesmo estágio de desenvolvimento, pelo teste de Tukey.

## 8.2 MACHOS

### 8.2.1 Viabilidade celular e atividade mitocondrial

A viabilidade celular dos espermatozoides de zebrafish submetidos a coleta seminal em diferentes estágios de *rigor mortis*, não diferiu entre os grupos experimentais ( $p= 0,0822$ ) (Figura 14A). O percentual de espermatozoides com morfologia normal foi maior ( $P<0,05$ ) nas amostras dos animais do grupo fresco/controle ( $55,25 \pm 6,084$  %), em relação aos animais no *rigor mortis* ( $28,90 \pm 8,491$ %) e do grupo *post rigor* ( $18,80 \pm 3,599$  %) (Figura 14B). Não houve diferença entre os grupos experimentais para a atividade mitocondrial dos espermatozoides ( $p=0,9417$ ) (Figura 14C).

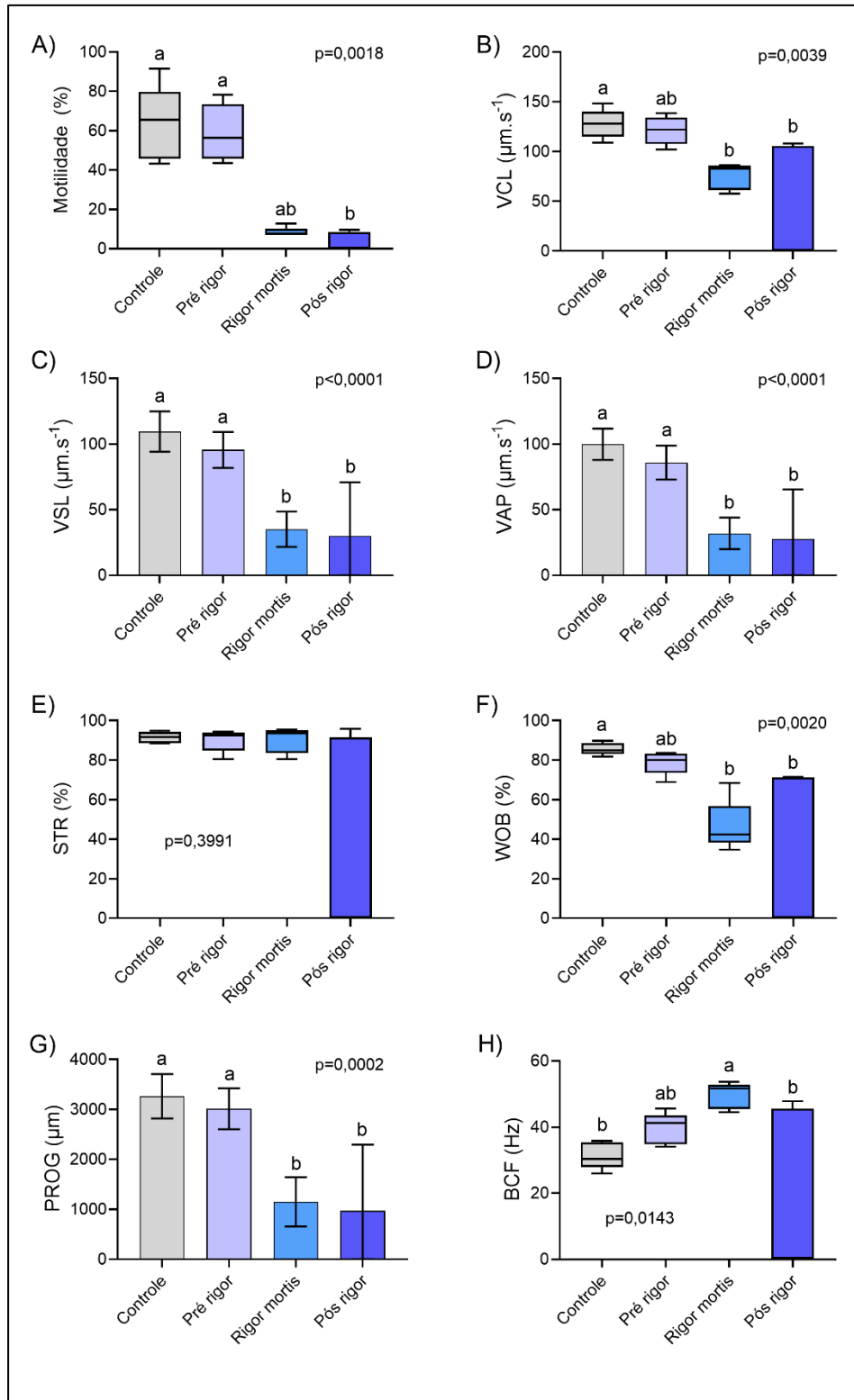


**Figura 14.** Viabilidade celular, espermatozoides com morfologia normal e atividade mitocondrial de espermatozoides de zebrafish coletados em diferentes estágios de *rigor mortis*. Para as variáveis de % de espermatozoides normais e atividade mitocondrial (MTT), letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais pela análise de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn. Para a variável Viabilidade celular, não houve diferença entre os grupos pela análise de variância (One-Way ANOVA)

### 8.2.2 Cinética Espermática

Os resultados da análise de cinética espermática e motilidade podem ser observados na figura a seguir. Houve efeito significativo do estágio de *rigor mortis* sobre as variáveis de motilidade espermática, VCL, VSL, VAP, WOB, PROG e BCF, sendo que apenas o STR não apresentou diferença entre os grupos. A motilidade espermática (Figure 15A) foi maior ( $P < 0,05$ ) nos animais dos grupos fresco/controle ( $63,23 \pm 19,03\%$ ) e pré-*rigor mortis* ( $58,96 \pm 14,38\%$ ), em relação ao grupo *post rigor* ( $3,34 \pm 4,65\%$ ). O VCL (Figura 15B) e WOB (Figura 15F) apresentaram maiores valores médios ( $P < 0,05$ ) no grupo fresco/controle,  $127,7 \pm 14,42 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  e  $85,61 \pm 3,045\%$ , respectivamente, em relação aos animais do grupo *rigor mortis* ( $75,45 \pm 13,22 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ;  $46,49 \pm 12,85\%$ ) e *post rigor* ( $42,16 \pm 57,76 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ;  $28,51 \pm 39,04\%$ ).

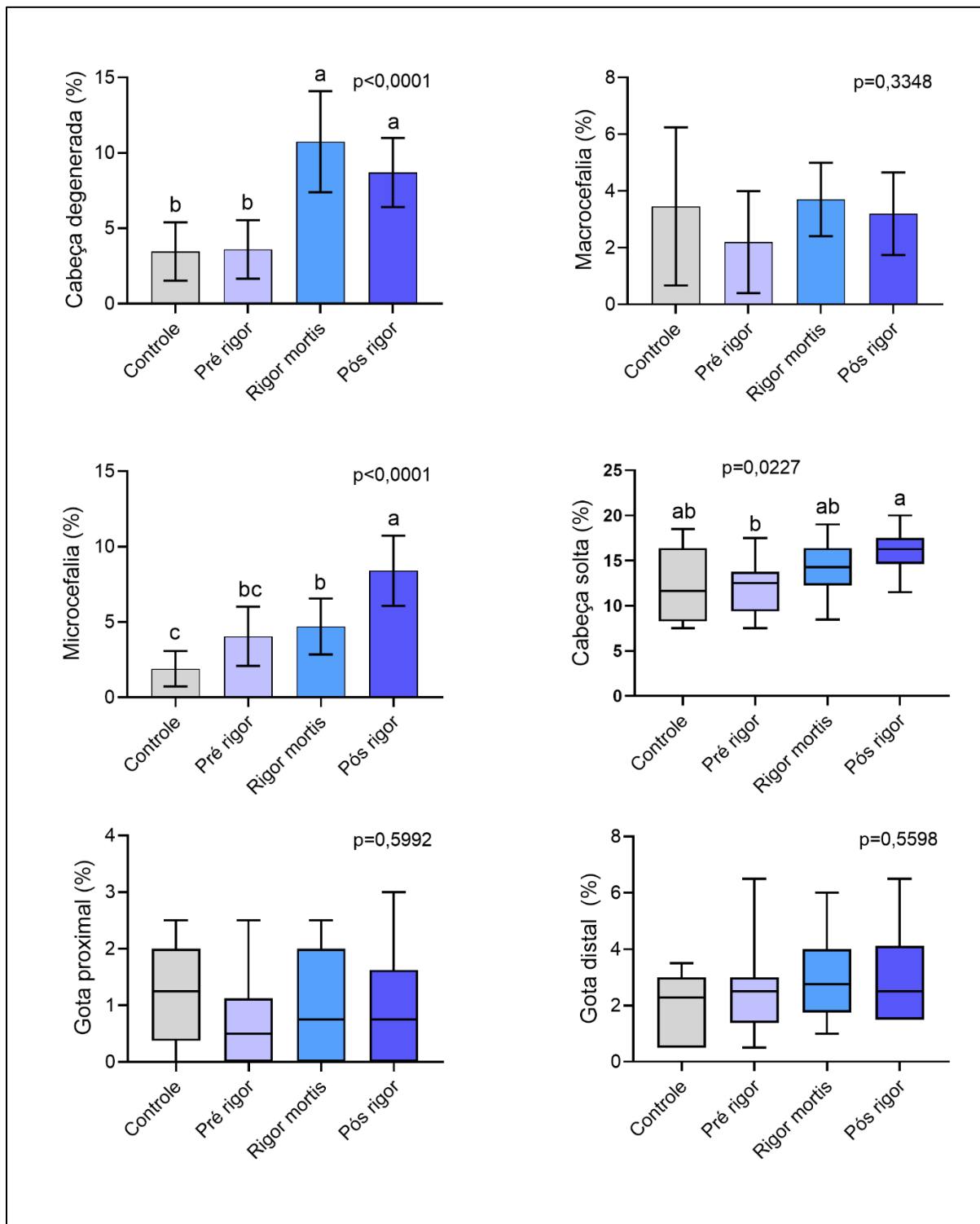
As variáveis VSL (Figura 15C), VAP (Figura 15D) e PROG (Figura 15G) apresentaram comportamento semelhante, sendo os maiores valores ( $P < 0,05$ ) nos animais do grupo fresco/controle (VSL:  $109,5 \pm 15,37 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ; VAP:  $99,86 \pm 11,96 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ; PROG:  $3263 \pm 445,5 \mu\text{m}$ ) e do grupo pré-*rigor mortis* (VSL:  $95,49 \pm 13,62 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ; VAP:  $85,88 \pm 12,95 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ; PROG:  $3011 \pm 408,8 \mu\text{m}$ ), diferindo dos demais grupos. O BCF foi maior ( $P < 0,05$ ) nas amostras dos animais do grupo *rigor mortis* ( $49,60 \pm 3,953 \text{ Hz}$ ), em relação aos grupos fresco/controle ( $31,42 \pm 4,027 \text{ Hz}$ ) e *post rigor* ( $18,24 \pm 25,03 \text{ Hz}$ ) (Figura 15H).



**Figura 15.** Variáveis do CASA de sêmen de zebrafish coletados em diferentes estágios de *rigor mortis*. Para as variáveis de motilidade, VCL, STR, WOB e BCF, letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais pela análise de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn. Para as variáveis VSL, VAP e PROG, letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais pela análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey.

### 8.2.3 Morfologia Espermática

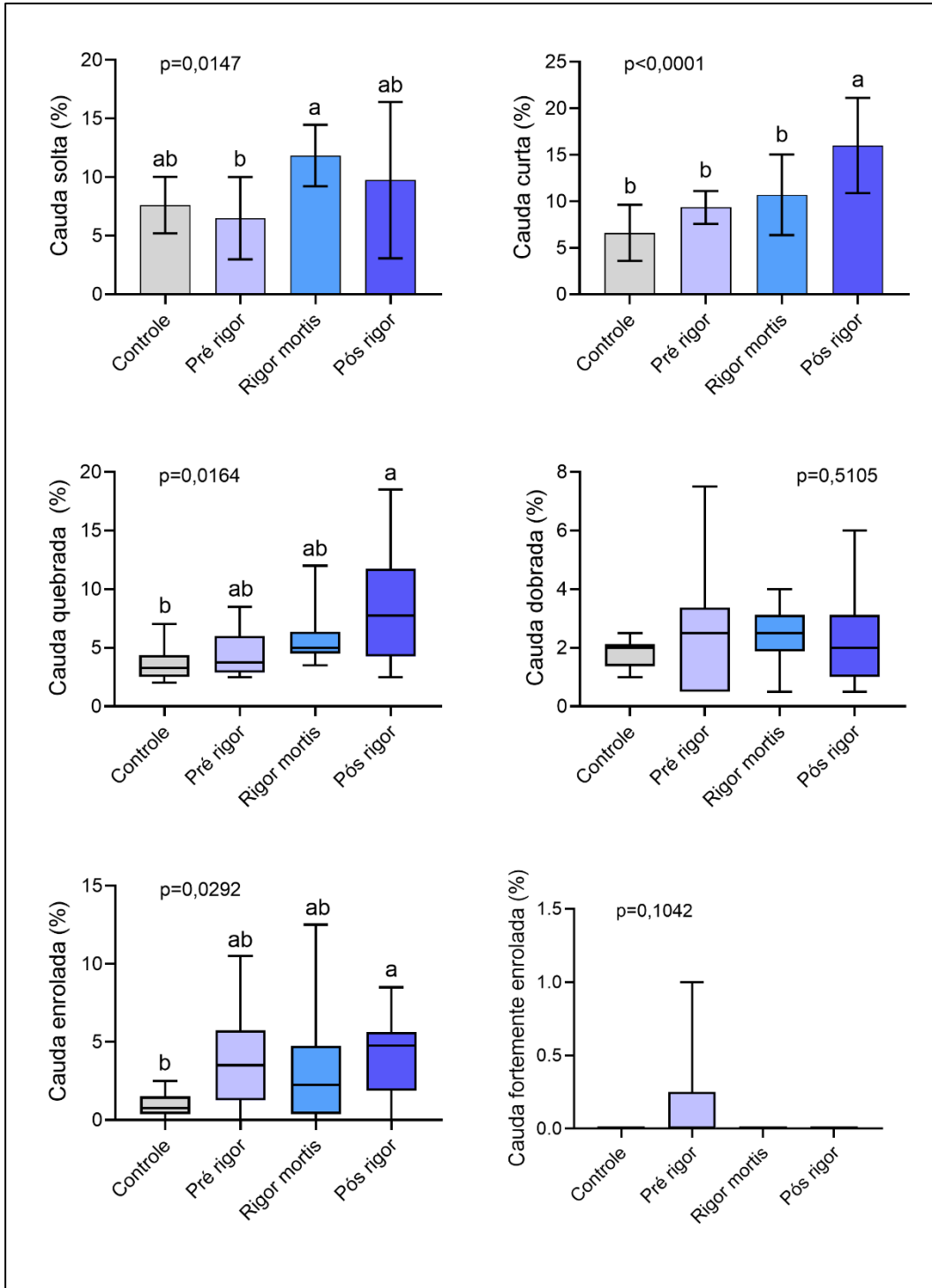
Os resultados da análise de morfologia espermáticas de cabeça e de gota citoplasmática podem ser observados na Figura 16. Houve diferença entre os grupos experimentais para o percentual de espermatozoides com cabeça degenerada, microcefalia e cabeça solta. Os maiores valores ( $P < 0,05$ ) de espermatozoides com cabeça degenerada foram observados nos grupos *rigor mortis* ( $10,75 \pm 3,352$  %) e *post rigor* ( $8,700 \pm 2,288$  %) (Figura 16A). A microcefalia foi maior nos animais do grupo *post rigor* ( $8,400 \pm 2,331$  %), e menor no grupo fresco/controle ( $1,903 \pm 1,172$  %), que diferiu também do grupo *rigor mortis* (Figura 16C). O percentual de espermatozoides com cabeça solta foi maior ( $P < 0,05$ ) no grupo *post rigor*, em relação ao grupo pré-*rigor mortis*. As demais alterações morfológicas de cabeça e de gota citoplasmática não diferiram entre os grupos experimentais.



**Figura 16.** Patologias de cabeça e de gota citoplasmática em espermatozoides de zebrafish coletados em diferentes estágios de *rigor mortis*. Para as variáveis de cabeça degenerada, macrocefalia e microcefalia, letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais pela análise de variância (One-Way ANOVA), seguido de teste de Tukey. Para as variáveis de cabeça solta, gota proximal e gota distal, letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais pela análise de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn



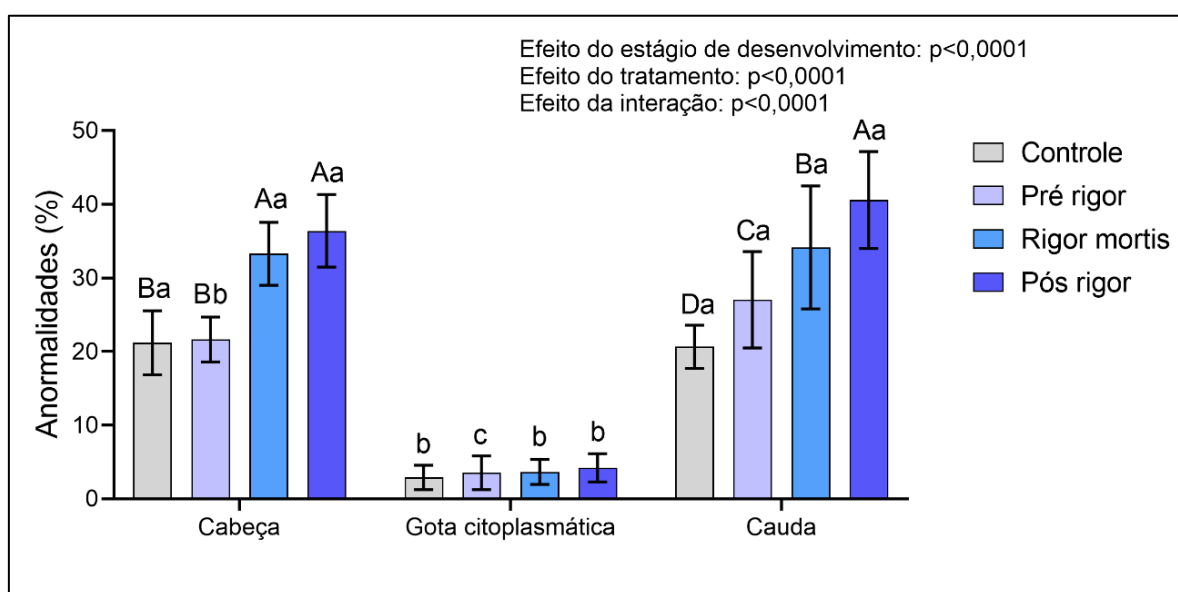
Os resultados da análise morfologia espermáticas de cauda podem ser observados na Figura 17. Houve diferença entre os grupos experimentais para o percentual de espermatozoides com cauda solta, curta, quebrada e enrolada. Os maiores valores ( $P < 0,05$ ) de cauda solta foram observados nos grupos *rigor mortis* ( $11,85 \pm 2,625 \%$ ), que diferiu estatisticamente do grupo *pré-rigor mortis* ( $6,500 \pm 3,512 \%$ ) (Figura 17A). A cauda curta foi maior nos espermatozoides do grupo *post rigor* ( $16,00 \pm 5,132 \%$ ) (Figura 17B). A cauda quebrada foi maior nas amostras coletas dos animais em *post rigor* ( $8,350 \pm 5,028 \%$ ), que diferiu significativamente do grupo fresco/controle ( $3,708 \pm 1,527 \%$ ) (Figura 17C). O percentual de espermatozoides com cauda enrolada foi maior no grupo *post rigor* ( $4,150 \pm 2,667 \%$ ), que diferiu estatisticamente do grupo fresco/controle ( $0,9013 \pm 0,7739 \%$ ) (Figura 17E). As demais alterações morfológicas de cauda não diferiram entre os grupos experimentais.



**Figura 17.** Patologias de cauda em espermatozoides de zebrafish coletados em diferentes estágios de *rigor mortis*. Para as variáveis de cauda solta e cauda curta, letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais pela análise de variância (One-Way ANOVA), seguido de teste de Tukey. Para as variáveis de cauda quebrada, cauda dobrada, cauda enrolada e cauda fortemente enrolada, letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais pela análise de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn.

Na figura 18, podemos observar a comparação entre os grupos experimentais para o somatório das morfologias espermáticas. Houve efeito significativo dos grupos experimentais, do tipo de alteração e interação entre os fatores. Os maiores valores ( $P < 0,05$ ) de alteração de cabeça foram observados nos grupos *rigor mortis* e *post rigor*. Para as alterações de cauda, houve diferença entre todos os grupos experimentais, sendo o maior valor ( $P < 0,05$ ) observado no grupo *post rigor*, seguido de *rigor mortis*, *pré-rigor mortis* e fresco/controlado. Não houve diferença entre os grupos experimentais para as alterações morfológicas de gota citoplasmática.

Para os grupos fresco/controlado, *rigor mortis* e *post rigor*, os maiores índices ( $P < 0,05$ ) de alterações morfológicas observadas foram de cabeça e de cauda, que diferiram estatisticamente das alterações do tipo gota citoplasmática. Já para o grupo *pré-rigor mortis*, houve maior % ( $P < 0,05$ ) de alterações de cauda, seguido de alterações de cabeça, e o menor valor para as de gotas citoplasmáticas.



**Figura 18.** Comparação entre os diferentes tipos de patologias de espermatozoides de zebrafish coletados em diferentes estágios de *rigor mortis*, para cada grupo experimental. Efeito do estágio de *rigor mortis* ( $p < 0,0001$ ), efeito do tipo de patologia ( $p < 0,0001$ ) e efeito da interação dos fatores ( $p < 0,0001$ ). Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os estágios de *rigor mortis* no mesmo tipo de patologia espermática, pelo teste de Tukey. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre os tipos de patologias espermáticas, dentro do mesmo estágio de *rigor mortis*, pelo teste de Tukey.

## 9 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi proposto um critério técnico presumível, em que o *rigor mortis* serviu como parâmetro para a construção e desenvolvimento de um protocolo eficiente. A partir deste critério foi possível estimar, com maior segurança e precisão, até que momento após a morte dos peixes é viável a coleta de gametas. Com isso, provamos ser factível usar e conservar células reprodutivas de animais encontrados mortos e com isso, futuras investigações não se limitem apenas com registros superficiais destes animais.

Nas análises de viabilidade celular (Live/Dead) e MTT em oócitos, as informações obtidas são complementares, possibilitando realizar uma avaliação precisa, porém não definitiva, quanto a viabilidade celular. Na análise estrutural usando o Live/Dead, ficou evidente que no estágio de maior degradação celular (*post rigor*), a média foi menor em todos os estágios de desenvolvimento celulares avaliados, frente aos outros critérios de avaliação (*fresco/controle*, *pré-rigor mortis* e *rigor mortis*). Porém, ao realizar o ensaio MTT, esperava-se uma confirmação dos resultados, o que não ocorreu, já que não houve diferença entre as médias obtidas entre os diferentes estágios avaliados.

De acordo com Gryshkov *et al.* (2015), resultados baseados apenas em análises de viabilidade de membrana celulares não são tão informativos quanto ao número de células vivas ou mortas, o que torna importante aplicá-las juntamente a um teste de avaliação metabólica, que são comprovadamente mais sensíveis em comparação a outros métodos isolados, como por exemplo, de coloração azul de tripan (Tsai *et al.*, 2010). Em oócitos, já foi observado por Marques *et al.* (2018) que o ensaio MTT tende a ser mais sensível em diferenciar tratamentos com maior viabilidade em relação aos com menor viabilidade, o que pode ser explicado pela alta quantidade de mitocôndrias em oócitos em estágios de desenvolvimento específicos.

Podemos presumir que no processo de degradação celular possa estar ocorrendo um aumento do metabolismo, decorrente da ação de bactérias atuantes nestes locais (ex. bactérias produtoras de ácido láctico, Grela *et al.*, 2018). Estas bactérias apresentam enzimas oxidoredutases, as quais podem interferir no ensaio MTT. No entanto, seria necessária investigação adicional a fim de verificar se as

bactérias atuantes no processo de rigor mortis poderiam de fato estar interferindo diretamente nesta análise. Porém, seria necessário investigar detalhadamente se bactérias atuantes no processo de *rigor mortis* possam ocasionar uma atividade mitocondrial neste tipo de análise.

Nos machos, as análises de ruptura da membrana celular (Live/Dead) e de atividade metabólica celular (MTT), demonstraram não haver diferenças qualitativas entre os diferentes estágios de *rigor mortis* e o sêmen fresco/controle. Entretanto, ao avaliar os resultados referentes à cinética espermática e a morfologia dos espermatozoides, observou-se uma sensível perda qualitativa destas células reprodutivas oriundas dos animais em *rigor mortis* e *post rigor mortis*. Nas análises de cinética, foi possível observar que em todas as variáveis analisadas, dos espermatozoides obtidos de animais em *pré-rigor*, não diferiram das amostras obtidas de animais fresco/controle. Estes dados demonstram que os espermatozoides apresentaram características cinéticas que viabilizassem seu uso, tal como obtidos em animais vivos.

A relevância desses resultados consiste na possibilidade de criar bancos de germoplasma de animais que já foram à óbito, até o período de *pré-rigor mortis*, sem perda qualitativa dos espermatozoides. Para realizar a criopreservação de sêmen de zebrafish, é minimamente necessário garantir que a motilidade de uma amostra fresca seja entre 80-95% (Wang *et al.*, 2015; Yang, *et al.*, 2016), e para isso, análises de motilidade espermática que obtenham resultados similares ao controle, demonstram potencial para esta finalidade.

Em estudos até então publicados, as análises de gametas foram realizadas após a obtenção do sêmen de animais inteiramente conservados em temperaturas negativas, apenas avaliando o decorrer de dias após a morte (Koteeswaran; Pandian, 2002). Um outro método de coleta proposto por Dietrich *et al.* (2006), que avaliou parâmetros de motilidade espermática *post mortem* em animais mantidos a baixas temperaturas, eutanasiados em diferentes concentrações de anestésico, em determinados minutos após o armazenamento. Em ambos os trabalhos não foram avaliadas cada etapa do processo de *rigor mortis* como parâmetro.

Nos resultados das análises de motilidade espermática média, amostras de sêmen coletadas de animais em *rigor mortis* não apresentaram diferenças em relação às coletadas de animais fresco/controle e em *pré-rigor mortis*, o que aparenta ser uma eventualidade, e não uma situação comum. A média absoluta foi discrepante entre as

amostras do fresco/controle e *pré-rigor mortis*, em comparação ao sêmen obtido em indivíduos no *post rigor*. Entretanto, ao se acrescentar mais elementos na cinética espermática, comparando exclusivamente animais em *pré-rigor mortis* e *rigor mortis*, as médias dos parâmetros VCL, WOB e BCF, também não diferiram.

Cabe ressaltar que o índice WOB depende do índice VCL, ou seja, estão diretamente relacionados. Os dados referentes à motilidade possibilitam supor que animais em *rigor mortis*, ainda são passíveis de fornecer células reprodutivas aptas a serem utilizadas. É importante compreender que no período de *pré-rigor mortis*, as médias resultantes foram iguais às amostras dos animais frescos/controle. Logo, o processo de degradação iniciou-se, mesmo que lentamente, até o pH atingir próximo de 6 e chegar à etapa do *rigor mortis*.

Para corroborar com as informações obtidas nos resultados de cinética espermática, e tentar compreender a redução percentual média destes índices (especialmente nos animais em *rigor mortis* e *post rigor*), a caracterização morfológica destes processos foi decisiva. Nesta análise, as anormalidades de cauda e cabeça dos espermatozoides foram mais representativas nos animais em *rigor mortis* e *post rigor*, apresentando valores percentuais médios acima de 30%. Espermatozoides com cauda curta e quebrada, especialmente nos animais em *post rigor*, os percentuais somaram mais de 25%. Estes resultados permitem inferir que a degeneração celular oriunda da autólise, causadora da degradação de tecidos e da quebra de membranas celulares (Datta, 2013; Savitri *et al.*, 2019), possam estar correlacionados.

O percentual médio de espermatozoides que apresentaram alterações morfológicas na cabeça foi notadamente mais elevado, em amostras coletadas de animais em *rigor mortis* e *post rigor*. O processo degradativo dos espermatozoides em ambos os estágios foram severos, especialmente em espermatozoides classificados com cabeça degenerada e microcefalia.

Os espermatozoides, estruturalmente se caracterizam por possuir a cabeça mais robusta em relação à cauda, especialmente para conferir proteção ao material genético. As anormalidades estruturais mais comumente relacionadas à cabeça dos espermatozoides são a perda da cauda. Além disso, a ocorrência de degeneração de cabeça sinaliza que possa estar ocorrendo um processo de autólise destas células. Do ponto de vista mecânico de natação dos espermatozoides, anormalidades morfológicas afetam negativamente a hidrodinâmica, causando alterações no

movimento celular e, por consequência, têm impacto na cinética espermática (Humphries, 2008; Da Costa *et al.*, 2022).

A ocorrência de microcefalia, anormalidade fortemente associada a espermatozoides jovens de mamíferos (Hafez e Hafez, 2004), foi expressiva em animais em *post rigor*, contudo, foi menos frequente nas amostras dos demais estágios analisados (*fresco/controlado*, *pré-rigor mortis* e *rigor mortis*). Como os animais utilizados possuíam a mesma faixa etária, pode-se inferir que o processo de degradação das gônadas tenha exposto um número maior de células jovens, que ainda não haviam completado o processo de formação.

Quanto às anormalidades morfológicas de cauda, foi observado um aumento nos valores à medida que ocorria o processo de degradação celular dos animais. Isto pode explicar não só a brusca queda da média de motilidade nos estágios de *rigor mortis* e *post rigor*, como também uma acelerada degradação da cauda, conforme o animal avança no processo de putrefação. No estágio *post rigor*, espermatozoides que apresentaram alterações de cauda curta e quebrada, atingiram mais de 25%.

De acordo com os dados obtidos neste estudo, o estágio *pré-rigor mortis* seria um momento limite para a coleta e preservação de gônadas de animais que possam ser encontrados mortos, sem perda nos índices qualitativos analisados, o que possibilitaria a aplicação de um protocolo de criopreservação. Por outro lado, em animais cujas células reprodutivas foram coletadas em estágios mais avançados de degradação, como *rigor mortis* e *post rigor*, compreende-se que há uma possibilidade de uso destas células, mesmo apresentando uma severa queda qualitativa. O reduzido número de células disponíveis pode ser suficiente para regenerar uma população impactada, ou até mesmo em um quadro mais extremo, evitar a extinção de uma espécie ameaçada.

## 10 CONCLUSÃO

Ocorreu uma perda qualitativa de células reprodutivas em machos e fêmeas, conforme o decorrer do processo de *rigor mortis*. Entretanto, as células reprodutivas de ambos os sexos, no estágio de *pré-rigor mortis* em relação aos animais vivos,

possuem índices qualitativos idênticos em praticamente a totalidade dos critérios de validação analisados.

### 10.1 Considerações finais

Durante a realização dos experimentos, foi observado que os tecidos ovariano e testicular coletados, ao longo do processo de *rigor mortis*, já encontravam-se em avançado estado de decomposição, o que por vezes, dificultou a coleta do material. Considerando os dados estatísticos, os quais indicaram que o estágio de *post rigor* apresentou menores valores em relação à viabilidade de oócitos e espermatozoides analisados, juntamente com a avançada decomposição deste material, a coleta dos tecidos neste estágio do processo de *rigor mortis* não seria vantajosa.

Os dados obtidos neste estudo sugerem que, de modo geral, o *pré-rigor mortis* seria um momento limite para a coleta e preservação de gônadas de animais que possam ser encontrados mortos. No entanto, para que posteriormente seja possível aplicar um protocolo de criopreservação nestes tecidos, análises complementares como histologia de gônadas, estresse oxidativo e danos de DNA para avaliar as células dos gametas, em diferentes estágios de *rigor mortis*, podem aprimorar a pesquisa.

Sendo assim, a coleta de gônadas *post mortem* para aplicação de protocolos de criopreservação é possível, desde que não ultrapasse os índices de *pré-rigor mortis* pleno, quando os tecidos ainda se encontram relativamente íntegros e a viabilidade dos gametas ainda é consideravelmente alta. Embora nos estágios de *rigor mortis* e *post rigor* ainda possa haver o uso das células, essas apresentam uma queda qualitativa significativa.



## REFERÊNCIAS

- ALI, S.; AALDERS, J.; RICHARDSON, M. K. Teratological effects of a panel of sixty water-soluble toxicants on zebrafish development. **Zebrafish**, Larchmont, v. 11, n. 2, p. 129-141, Apr. 2014.
- AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition. Schaumburg, IL: American Veterinary Medical Association, 2020. 121 p.
- BERGSTEIN, T. G.; WEISS, R. R.; BICUDO, S. D. Técnicas de análise de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 38, n. 4, p.189-194, 2014.
- BROOKS, J. W. Postmortem changes in animal carcasses and estimation of the postmortem interval. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 53, n. 5, p. 929-940, 2016.
- BRYANT, B. H.; BOEKELHEIDE, K. Time-dependente changes in *post mortem* testis histopathology in the rat. **Toxicologic Pathology**, Thousand Oaks, v. 35, n. 5, p. 665-671, 2007.
- CACHAT, J. *et al.* Modeling with drawl syndrome in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 208, n. 2, p. 371-376, 2009.
- CARSON, F. L.; HLADIK, C. **Histotechnology**: a self-instructional text. 3rd ed. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology, 2009.
- CONTRERAS, E. S. G. **Bioquímica de pescados e derivados**. Jaboticabal: FUNEP, 1994.
- COSTA, B. *et al.* Characterization of sperm quality in *Brycon hilarii*: how does morphology affect sperm movement? **Theriogenology Wild**, New York, v. 1, [art.] 100007, 2022.
- DARROW, K. O.; HARRIS, W. Characterization and development of courtship in Zebrafish, *Danio rerio*. **Zebrafish**, Larchmont, v. 1, n. 1, p. 40-45, 2004.
- DATTA, S. Rigor mortis and fish spoilage. *In*: MAHAPATRA, B. K. *et al.* (ed.). **Training manual on fish processing and value-added fish products**. 3rd ed. Mumbai: Central Institute of Fisheries Education, 2013.
- CARVALHO, A. F. S. *et al.* Efficacy of fish embryo vitrification protocols in terms of embryo morphology — a systematic review. **Cryoletters**, London, v. 35, n. 5, p. 361-370, 2014.
- DELBARRE-LADRAT, C. *et al.* Trends in postmortem aging in fish: understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 46, n. 5, p. 409-421, 2006.

DIETRICH, G. J. *et al.* Motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa in relation to sequential collection of milt, time of *post mortem* storage and anesthesia. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 31, p. 1–9, 2005.

DUNFORD, K. *et al.* Stiff as a board: measuring *rigor mortis* in zebrafish. **Animal Technology and Welfare**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 203-205, 2019.

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

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of world fisheries and aquaculture: towards blue transformation**. Rome: FAO, 2022. Disponível em: <https://www.fao.org/3/cc0461en/cc0461en.pdf> . Acesso em: 10 abr. 2023.

FERGUSON, H. W. **Systemic pathology of fish: a text and atlas of normal tissues in teleosts and their responses in disease**. 2nd ed. London: Scotian Press, 2006.

FONTENELE, R.; SANTOS, E.; MOTA, S. Índice de rigor mortis de tilápias do nilo abatidas de diferentes formas após cultivo em esgoto doméstico tratado. **Conexões Ciências e Tecnologia**, Fortaleza, v. 7, n. 2, p. 61-72, 2013.

FURNESVIK, L. *et al.* Evaluation of histological post-mortem changes in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) at different time intervals and storage temperatures. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 45, n. 10, p. 1571-1580, 2022.

GATICA, M. C. *et al.* Effects of well-boat transportation on the muscle pH and onset of rigor mortis in Atlantic salmon. **Veterinary Record**, London, v. 163, n. 4, p. 111–116, 2008.

GARNER, D. L.; JOHNSON, L. A. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 53, n. 2, p. 276–284, 1995.

GEORGE, J. *et al.* Histopathologic evaluation of postmortem autolytic changes in bluegill (*Lepomis macrochirus*) and crappie (*Pomoxis anularis*) at varied time intervals and storage temperatures. **PeerJ**, Corte Madera, v. 4, [art.] e1943, 2016.

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

GRELA, E.; KOZŁOWSKA, J.; GRABOWIECKA, A. Current methodology of MTT assay in bacteria - A review. **Acta Histochemica**, Jena, v. 120, n. 4, p. 303-311, 2018.

GRIER, H. J. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. *In*: RUSSEL, L. D.; GRISWOLD, M. D. (ed.). **The sertoli cell**. Clearwater: Cache River, 1993. p. 704–739.

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

HANCOCK, J. L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of the Royal Microscopical Society**, London, v. 76, p. 84-97, 1957.

HAZEN, E. L. *et al.* A dynamic ocean management tool to reduce bycatch and support sustainable fisheries. **Science Advances**, Washington, DC, v. 4, n. 5, [art.] eaar3001, 2018.

HEIL, N. **National wild fish health survey - laboratory procedures manual**. 5th ed. Warm Springs: US Fish and Wildlife Service, 2009.

HERMAN, H. **The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle (including techniques for goats, sheep, horses and swine): a handbook and laboratory manual for students, herd operators and workers in the al field**. Illinois: Interstate Publishers, 1987. 279 p.

HIRAMATSU, N. T. *et al.* Ovarian yolk formation in fishes: molecular mechanisms underlying formation of lipid droplets and vitellogenin-derived yolk proteins. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 221, p. 9-15, 2015.

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

HUMPHRIES, S.; EVANS, J. P.; SIMMONS, L. W. Sperm competition: linking form to function. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 8, [art.] 319, [p.1-11], 2008.

HUSS, H. H. **Garantia de qualidade dos produtos da pesca**. Rome, FAO, 1997. 176 p. (FAO Documento Técnico sobre as Pescas, 334). Disponível em: <http://www.fao.org/DOCREP/003/T1768P/T1768P00.htm#TOC>. Acesso em: 18 jun. 2022.

JONES, K. H.; SENFT, J. A. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate–propidium iodide. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Thousand Oaks, v. 33, p. 77-79, 1985.

JORDAN, L. K. *et al.* Linking sensory biology and fisheries bycatch reduction in elasmobranch fishes: a review with new directions for research. **Conservation Physiology**, Oxford, v. 1, n. 1, [art.] cot002, 2013.

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

KORHONEN, R. W.; LANIER, T. C. An evaluation of simple methods for following rigor development in fish. **Journal of Food Science**, Malden, v. 55, n. 2, p. 346-348, 1990.

- KOTEESWARAN, R.; PANDIAN, T. Live sperm from *post mortem* preserved Indian catfish. **Current Science**, Bangalore, v. 82, n. 4, p. 447-450, 2002.
- KURTZMAN, M. S. *et al.* Sexually segregated housing results in improved early larval survival in zebrafish. **Lab Animal**, New York, v. 39, n. 6, p. 183-189, 2010.
- LAWRANCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 269, n. 1/4, p. 1-20, 2007.
- LEAL, M. C. *et al.* Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 81, p. 177-187, 2009.
- LEERBERG, D. M.; SANO, K.; DRAPER, B. W. Fibroblast growth factor signaling is required for early somatic gonad development in zebrafish. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 13, n. 9, [art.] e1006993, 2017.
- LI, J.; GE, W. Zebrafish as a model for studying ovarian development: recent advances from targeted gene knockout studies. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Limerick, v. 507, [art.]110778, 2020.
- LOWERRE-BARBIERI, S. K. *et al.* Emerging issues and methodological advances in fisheries reproductive biology. **Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science**, Bethesda, v. 3, n. 1, p. 32–51, 2011.
- LUBZENS, E. Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 165, p. 367–389, 2010.
- MAACK, G.; SEGNER, H. Morphological development of the gonads in zebrafish. **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 62, p. 895-906, 2003.
- MALLAT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 42, n. 4, p. 630–648, 1985.
- MATSUYAMA, M. *et al.* Diurnal rhythm of steroid hormone levels in the Japanese whiting, *Sillago japonica*, a daily-spawning teleost. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 8, p. 329–338, 1990.
- MATTHEWS, J.; CARMICHAEL, C. **ZIRC E400/RMMB sperm cryopreservation protocol**. Eugene, OR: Zebrafish International Resource Center, 2015.
- MATTHEWS, M.; VARGA, Z. M. Anesthesia and euthanasia in zebrafish. **ILAR Journal**, Oxford, v. 53, n. 2, p. 192-204, 2012.
- MILIORINI, A. B. *et al.* A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 177–187, 2011.

MUKUNDAN, M. K.; ANTONY, P. D.; NAIR, M. R. A review on autolysis in fish. **Fisheries Research**, Amsterdam, v. 4, p. 259-269, 1986.

MURUA, H.; MOTOS, L.; LUCIO, P. Reproductive modality and batch fecundity of the European hake, *Merluccius merluccius*, in the Bay of Biscay. **California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Report**, Los Altos, v. 39, p. 196–204, 1998.

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

NISHIMURA, H.; L'HERNAULT, S. W. Spermatogenesis. **Current Biology**, London, v. 27, n. 18, p. R988–R994, 2017.

NÓBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; FRANÇA, L. R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 35, p. 197–206, 2009.

OCTAVERA, A.; YOSHIZAKI, G. Production of chinese rosy bitterling offspring derived from frozen and vitrified whole testis by spermatogonial transplantation. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 46, p. 1431-1442, 2020.

OGAWA, M.; MAIA, E. L. **Manual de pesca: ciência e tecnologia do pescado**. São Paulo: Varela, 1999.

PAKSA, A.; RAZ, E. Zebrafish germ cells: motility and guided migration. **Current Opinion in Cell Biology**, Philadelphia, v. 36, p. 80–85, 2015.

PALACIOS-ABRANTES, J. *et al.* The transboundary nature of the world's exploited marine species. **Scientific Reports**, London, v. 10, n. 1, [art.] 17668, 2020.

PEDERSEN, E. J. *et al.* Signatures of the collapse and incipient recovery of an overexploited marine ecosystem. **Royal Society Open Science**, London, v. 4, n. 7, [art.] 170215, 2017.

PUDNEY, J. Comparative cytology of the non-mammalian vertebrate Sertoli cell. *In*: RUSSELL, L. D.; GRISWOLD, M. D. (ed.). **The sertoli cell**. Clearwater, FL: Cache River, 1993. p. 612–657.

QIAN, P. *et al.* Single cell transcriptome sequencing of zebrafish testis revealed novel spermatogenesis marker genes and stronger leydig-germ cell paracrine interactions. **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v. 13, [art.] 851719, 2022.

RAZ, E. Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective. **Nature Reviews. Genetics**, London, v. 4, n. 9, p. 690–700, 2003.

RODRIGUES, M. *et al.* Spermatogenesis in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*: a histological analysis with emphasis to spermatogonial and spermatid types. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 41, p. 697–705, 2015. Número especial.

SANTOS, R. R. *et al.* Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germ line preservation of endangered species and breeds. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 122, n. 3/4, p. 151-163, 2010.

SCHULZ, R. W.; NÓBREGA, R. H. Anatomy and histology of fish testis. *In*: FARRELL, A. P. (ed.). **Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment**. San Diego: Academic Press, 2011. v. 1, p. 616–626.

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

SHINOHARA, T. *et al.* Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and in-vitro micro insemination. **Human Reproduction**, Oxford, v. 17, n. 12, p. 3039-3045, 2002.

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, p. 127-137, 2007.

SIQUEIRA-SILVA, D. H.; RODRIGUES, M. S.; NÓBREGA, R. H. Testis structure, spermatogonial niche and Sertoli cell efficiency in Neotropical fish. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 273, p. 218-226, 2018.

SPEARE, D. J.; FERGUSON, H. W. Clinical and pathological features of common gill diseases of cultured salmonids in Ontario. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 30, n. 11, [art.], 882, 1989.

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

STREIT JUNIOR, D. P. *et al.* Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 7, p. 157–162, 2004.

STROUD, R. G. **Rigor in fish: the effect on quality**. Edinburgh: FAO, 1969. (Torry Advisory Note, no. 36).

TAKAHASHI, H. Juvenile hermaphroditism in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. **Bulletin of Fisheries Sciences, Hokkaido University**, Sapporo, v. 28, n. 2, p. 25-65, 1977.

THARASANIT, T. *et al.* Birth of kittens after the transfer of frozen-thawed embryos produced by intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa collected from cryopreserved testicular tissue. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 47, n. 6, p. 305-308, 2012.

TICKNER, D. *et al.* Bending the curve of global freshwater biodiversity loss – an emergency recovery plan. **BioScience**, Oxford, v. 70, n. 4, p. 330–342, 2020.

TREVES-BROWN, K. M. Anaesthetics. *In*: TREVES-BROWN, K. M. **Applied fish pharmacology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. (Aquaculture Series, 3). Cap. 16, p. 206-219.

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

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

WESTERFIELD, M. **The zebrafish book: a guide for the laboratory use of Zebrafish (*Danio rerio*)**. 4th ed. Eugene: University of Oregon Press, 2000.

WHEATON, F. W.; LAWSON, T. B. **Processing aquatic food products**. [Ottawa]: John Wiley, 1985.

WILSON-LEEDY; Jonas G.; INGERMANN, Rolf L. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. **Theriogenology**, Los Altos, v. 67, n. 3, p. 661-672, Feb. 2007.

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

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

ZDRAVKOVIĆ, M.; KOSTOV, M.; STOJANOVIĆ, M. Identification of postmortem autolytic changes on the kidney tissue using PAS stained method. **Facta Universitatis Series: Medicine and Biology**, Niš, v. 13, n. 3, p. 181-184, 2006.

ZIMMERHACKEL, J. S. *et al.* Catch, bycatch and discards of the Galapagos Marine Reserve small-scale handline fishery. **PeerJ**, Corte Madera, v. 3, [art.] e995, 2015.

## VITA

Renata Villar Dantas, nascida em Porto Alegre, no dia 14 de março de 1986, filha de Angela Maria Garcia Villar e Renato Souza Dantas, concluiu o ensino fundamental no Colégio Rosário, e o ensino médio no Colégio Unificado. Graduada em Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas, pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), em 2015. Após a graduação, atuou por seis anos como Técnica em Biotério de Produção e Experimentação Animal no Centro de Modelos Biológicos e Experimentais (CeMBE), da PUCRS, trabalhando em conjunto com médicos veterinários na produção e manutenção de colônias de roedores SPF (*Specific-Pathogen-Free*) para uso experimental, e de zebrafish e roedores já em experimentação.

Deu início à Pós-graduação em Zootecnia, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em 2021, na área de concentração de Produção Animal, como bolsista CAPES. Durante o período, realizou atividades de pesquisa e ensino junto ao Grupo de Pesquisa AQUAM (Produção e Conservação da Biodiversidade das Espécies Aquáticas), sob a coordenação do professor orientador Danilo Pedro Streit Jr., com foco em desenvolvimento e aprimoramentos de técnicas reprodutivas, avaliação de qualidade e criopreservação de gametas de peixes e bem-estar animal.