

"Impacto da Temperatura na Mobilidade Espermática de *Danio rerio* (F. Hamilton, 1822) (Cypriniformes: Crypinidae): Implicações para a Reprodução

BOAVENTURA LOBO CENTENO FILHO¹; IZANI BONEL ACOSTA²; CARINE CORCINI³

¹Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) 1 – turinha.centeno@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – izanibonel@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – corcnicd@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As últimas previsões do IPCC mostram que a temperatura global média irá aumentar cerca de 5,7°C, caso as taxas de emissões de gases estufas se mantenham elevadas (IPCC, 2023). Em consequência dessa mudança climática severa, as temperaturas máximas e mínimas de uma região serão alteradas, ocasionando danos biológicos, em específico à fauna local (LIBONATI ET AL., 2022). Essas mudanças climáticas também estão diretamente ligadas ao aumento das temperaturas dos corpos d'água, por estes absorverem mais calor (IPCC, 2023). Isso tem implicações profundas para a vida marinha e a de água doce. Dentre os animais susceptíveis à essas alterações climáticas, os ectotérmicos, como por exemplo os peixes, são os mais sensíveis (SUNDAY ET AL., 2014), uma vez que a sua temperatura corporal interna acompanha a temperatura do ambiente (DAVENPORT, 2012).

Algumas espécies de peixes, apresentam uma fecundação externa, ou seja, tanto os espermatozoides quanto os óvulos são liberados na água (COSSON, 2004). Isso ocorre pois os espermatozoides destes peixes ficam ativos, ou seja, apresentam cinética espermática (i.e. motilidade), somente quando entram em contato com um meio aquoso de baixa osmolalidade (LAHNSTEINER & PATZNER, 2008). Esta cinética espermática é utilizada como indicador de qualidade do espermatozóide e é influenciada por diversos fatores, como a temperatura (VETTORAZZI, 2012). Nesse contexto, estudos mostram que quando ocorre uma elevação da temperatura dos corpos d'água, isto afeta significativamente a cinética espermática, diminuindo a motilidade (HUANG ET AL., 2013) e a vitalidade do espermatozoide (LIMA ET AL., 2016). Ainda HIGUCHI et al. (2004) destacaram, com espermatozoides de *Danio rerio* (F. HAMILTON, 1822) (Cypriniformes: Crypinidae), a relação direta entre o aumento da temperatura e o aumento na velocidade de natação dos espermatozoides. Todas essas alterações impactam a reprodução deste animal.

O *Danio rerio*, ou zebrafish, é um peixe tropical pertencente à família Cyprinidae, e tem sido amplamente utilizada em pesquisas científicas nas últimas décadas, tornando-se um dos modelos mais valiosos e versáteis em biologia (LAWRENCE, 2007).

Assim, neste trabalho, exploramos as implicações da variação térmica na reprodução de *Danio rerio*, mais conhecido como zebrafish, testando o efeito da temperatura na cinética espermática desta espécie.

2. METODOLOGIA

Para o presente trabalho, foram utilizados peixes da espécie *Danio rerio*, popularmente denominado Zebrafish. Estes foram obtidos do biotério de Ictiologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), no campus Capão do Leão.

Para as experimentações, foram utilizados peixes machos com maturidade reprodutiva. Para testar o efeito da temperatura no espermatozoide de *D. rerio*, o ejaculado foi exposto à diferentes tratamentos térmicos, sendo 20°C o controle, 17°C a temperatura mais fria, e 25, 28 e 30°C as mais quentes. As exposições térmicas foram feitas tanto durante a manutenção da viabilidade dos espermatozoides no Beltsville Thawing Solution (BTS), controlando a temperatura da mistura esperma e BTS, quanto durante a ativação deles, mantendo a temperatura da água constante, ambos de acordo com os respectivos tratamentos. O ejaculado foi diluindo em BTS de forma isotérmica, com pH 7,2 e osmolaridade 330 mOsm/Kg, na proporção 1:9 (v/v), com o intuito de manter os espermatozoides viáveis para o experimento. O conteúdo seminal de cada peixe (25 peixes) foi individualmente distribuído nos 5 tratamentos.

Os espermatozoides foram ativados ao adicionar 1 µL da amostra em 3 µL de água destilada. Todas as análises de cinética espermática foram feitas pelo Computer Assisted Semen Analysis – CASA, com o espermatozoide ativado, dispostos em uma lâmina, usando um microscópio. No CASA, dez campos foram avaliados dentro de 5 a 10 s do processo de ativação, e pelo menos 1000 células foram analisadas. Os parâmetros mensurados foram a motilidade total (%), motilidade progressiva (%), VCL (velocidade curvilínea, µm / s), VSL (velocidade linear reta, µm / s), VAP (velocidade média do percurso, µm / s), LIN (Linearidade, [VSL / VCL] x100), distância média percorrida DAP (µm), distância curvilínea DCL (µm), distância retilínea DSL (µm), velocidade (VSL / VAP%), deslocamento lateral da cabeça ALH (µm) e velocidade retilínea VSL (µm), BCF batimento cruzado (Hz) (DZIEWULSKA et al., 2011). Seguindo o protocolo de Varela et al. (2015), o tempo de motilidade (T.M.) é entre o começo da ativação e o término do movimento, dos espermatozoides.

Foi feito o teste da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, para a seguir ser realizada a análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey. Os diferentes tratamentos térmicos (17, 20 e 25°C) são as variáveis independentes, enquanto todas as outras variáveis, da cinética espermática e as da citometria de fluxo, são as dependentes. O software Statistix 2010 foi utilizado. O valor de $p < 0,05$ foi considerado para elucidar as diferenças significativas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram que somente a motilidade total (%) e a motilidade progressiva diferem significativamente (Tabela 1), mostrando que quanto maior a temperatura, menor a motilidade total e a progressiva do espermatozoide. Já em VCL, os gametas expostos à 17°C apresentam um decréscimo significativo em relação à 25°C, e ambos são semelhantes à 20°C (Tabela 1). Ademais, espermatozoides expostos à 17°C aumentam a LIN e WOB, em relação à 20°C, mas com ambos os tratamentos térmicos não diferindo de 25°C (Tabela 1). Ainda, o esperma exposto à 20°C apresentam valores elevados de ALH e BCF, em relação à 17°C, mas não diferiram entre si. Por fim, em DAP, DCL, DSL, VAP, VSL e STR, não houve diferença significativa entre os todos os tratamentos térmicos (Tabela 1).

Tabela 1: Cinética Espermática Dos Espermatozoides De *Danio rerio*, Que Foram Submetidos a Diferentes Temperaturas de Tratamento, Nomeadamente 17°C, 20°C e 25°C.

Temperatura	17°C	20°C	25°C	
Cinética Espermática	Média	Média	Média	P valor
MotTotal	60,293±0,9854^a	53,936±1,4639^b	34,325±1,3506^c	<0,05
MotProg	50,516±1,0637^a	42,825±1,6258^b	24,891±1,4176^c	<0,05
DAP	16,315±1,0858	17,391±1,6216	19,531±1,1288	
DCL	21,091±1,3401	22,264±1,7088	23,661±1,1835	
DSL	14,624±1,1198	15,164±1,582	17,459±1,1662	
VAP	32,274±1,9881	38,459±4,1745	42,037±2,3928	
VCL	39,219±2,4316^b	48,862±4,3696^{ab}	50,967±2,5352^a	<0,05
VSL	27,891±1,9924	33,476±4,0598	37,502±2,458	
STR	0,8556±0,0142	0,8382±0,0148	0,8631±0,0136	
LIN	0,7282±0,0257^a	0,6507±0,0219^b	0,7138±0,021^{ab}	<0,05
WOB	0,826±0,0218^a	0,7649±0,0177^b	0,8162±0,0144^{ab}	<0,05
ALH	0,8955±0,0541^b	1,326±0,0927^a	1,2731±0,1063^a	<0,05
BCF	24,64±0,9933^b	28,183±0,9702^a	28,519±1,0093^a	<0,05

*Diferentes letras indicam diferença significativa entre os tratamentos.

Os tratamentos 28 e 30°C não apresentaram resultados na cinética espermática, uma vez que ambos os tratamentos resultaram em 100% de mortalidade dos espermatozoides, antes das análises serem realizadas.

No presente trabalho, os espermatozoides apresentam uma VCL significativamente maior quando expostos ao tratamento de 25°C. Contudo, apesar de se locomover mais rápido, estes espermatozoides permanecem menos tempo ativo, refletindo uma menor motilidade total e uma menor motilidade progressiva, em relação a 17 e 20°C. Esses dados corroboram com o elucidado por estudo anterior, o qual encontrou uma relação inversamente proporcional entre temperatura e motilidade, em peixe (BOMBARDELLI ET AL., 2013).

Ainda relacionado à motilidade, espermatozoides à 20°C elevam o BCF, quando comparado à 17°C, mas não diferem de 25°C, indicando uma estabilização do batimento flagelar, apesar do aumento de temperatura. Isso corrobora com BILLARD & COSSON (1992), que demonstraram uma estabilização do batimento flagelar a partir de 21°C, apesar da relação positiva entre esse parâmetro e a temperatura. Ainda, BILLARD & COSSON (1992) demonstram que um maior batimento flagelar indica uma maior capacidade de fertilização do esperma. Assim, um maior BCF à 25°C indicaria uma maior fertilidade. Contudo, essa relação contrasta com a da motilidade com a temperatura, que é negativa, como comprovado neste trabalho. Dessa forma, ao relacionar os resultados de BCF com os da motilidade, sugere-se que apesar do espermatozoide bater mais rapidamente o seu flagelo, isso não seria o suficiente para aumentar a fertilidade da espécie, uma vez que o espermatozoide não atinge o óvulo.

A relação entre a motilidade e a fertilidade foi demonstrada por GOMES et al (2012), ao associarem a temperatura de 28 °C a uma redução de 50% na taxa de fertilização em *Danio rerio*, uma vez que a motilidade foi reduzida. No presente trabalho a temperatura de 28°C ocasionou uma mortalidade de 100% dos espermatozoides. Assim, sugere-se que a redução na taxa de fertilização seria de 100%, ao invés do valor de 50% encontrado por GOMES et al (2012), uma vez que nenhum espermatozoide conseguiria fecundar os óvulos.

4. CONCLUSÕES

Portanto, se observa no presente trabalho que a temperatura elevada é um importante fator ambiental que afeta diretamente a qualidade espermática de *Danio rerio*, podendo, assim, causar prejuízos na fertilidade desta espécie.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BILLARD, R.; COSSON, M. P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *Journal of Experimental Zoology*, v. 261, n. 3, p. 122-131, 1992.
- BOMBARDELLI, R. A. et al. Effects of the spermatozoa: oocyte ratio, water volume, and water temperature on artificial fertilization and sperm activation of cascudo-preto. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 42, n. 1, p. 1-6, jan. 2013.
- COSSON, M. Sperm motility in fishes. *Theriogenology*, v. 62, n. 1, p. 1-14, 2004.
- DZIEWULSKA, K. et al. Post-thawed motility and fertility from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) sperm frozen with four cryodiluents in straws or pellets. *Theriogenology*, v. 76, n. 2, p. 300-311, 2011. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.02.007.
- GOMES, L.; PEREIRA, J.; GONÇALVES, L. Effects of temperature on sperm quality in zebrafish (*Danio rerio*). *Theriogenology*, v. 78, n. 8, p. 1418-1426, 2012.
- HIGUCHI, K. et al. Effects of temperature on sperm motility in the medaka *Oryzias latipes*. *Theriogenology*, v. 62, n. 2-3, p. 161-172, 2004.
- LAHSTEINER, M.; PATZNER, R. A. Fine structure of the sperm of the teleost fish *Carassius auratus* (Cyprinidae). *Cell and Tissue Research*, v. 323, n. 3, p. 437-446, 2008.
- LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. *Aquaculture*, v. 269, n. 1-4, p. 1-20, 2007. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.04.077.
- LIBONATI, R. et al. Assessing the role of compound drought and heatwave events on unprecedented 2020 wildfires in the Pantanal. *Environ. Res. Lett.*, v. 17, n. 1, 015005, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ac462e>.
- LIMA, F.; COSTA, R.; PEREIRA, J. Impact of temperature on sperm quality, fertilization rate, and embryonic development in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture*, v. 451, p. 10-16, 2016.
- MURGAS, L. D. S. et al. Fertilization capacity and sperm motility in *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) under the influence of different pH values. *Zygote*, v. 19, n. 2, p. 119-127, 2011.
- ROUTRAY, S. et al. Studies on certain semen parameters and its influence on fertilization success in Indian major carps (Pisces: Cyprinidae). *Reproduction in Domestic Animals*, v. 42, n. 5, p. 532-537, 2007.
- VARELA JUNIOR, A. S. et al. Methods of cryopreservation of Tambaqui semen, *Colossoma macropomum*. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 157, p. 71-77, 2015. doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.03.017.
- VETTORAZZI, G. et al. Influence of osmolality, ions and pH on sperm motility and fertilization in a Neotropical catfish, *Astyanax altiparanae*. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 38, n. 2, p. 423-431, 2012.