

## Influência da osmolaridade da solução diluidora sobre a motilidade de espermatozoides de zebrafish

JULIANA RIBEIRO PEGORARO<sup>1</sup>; FERNANDA RODRIGUES MENDONÇA<sup>2</sup>;  
IZANI BONEL ACOSTA<sup>3</sup>; CAROLINA VIEGAS PINTO<sup>4</sup>; CARINE DAHL CORCINI<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas - ribeiropegoraro@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas - nandarm.vet@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas - izanibonel@hotmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas - carolinaviegas18@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas - corcincd@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

O zebrafish (*Danio rerio*) destaca-se como um dos principais organismos aquáticos em estudos científicos, devido à sua homologia genética com o ser humano e sua elevada taxa de fertilidade (RODRIGUES, 2020). Embora a espécie tenha capacidade reprodutiva desde os quatro meses após a fertilização até os 3 anos de idade, a eficiência reprodutiva decresce progressivamente com a idade. Assim, para fins de pesquisa, recomenda-se a utilização de indivíduos com idade entre 6 e 18 meses (NASIADKA *et.al.*, 2012).

A avaliação da motilidade espermática é crucial para determinar a qualidade do sêmen, sendo este parâmetro afetado por múltiplos fatores, entre eles temperatura, estado nutricional e solução ativadora empregada (GODINHO, 2000; FELIZARDO *et.al.*, 2011). A diluição espermática, especificamente, é um elemento central na dinâmica de ativação do sêmen (SHIMODA, *et.al.*, 2007). É essencial que os agentes diluidores mantenham uma osmolaridade adequada, visto que ajustes nesta variável podem iniciar ou interromper a motilidade espermática. Uma ativação prematura da motilidade pode resultar em perda de viabilidade do material genético (RODRIGUES, 2020).

Diante disso, este trabalho tem como objetivo avaliar a motilidade do sêmen de zebrafish (*Danio rerio*) submetido a diferentes osmolaridades, buscando identificar a osmolaridade ótima para diluentes e crioprotetores na espécie.

### 2. METODOLOGIA

Este estudo foi realizado no laboratório de Andrologia da Faculdade de Medicina Veterinária, na Universidade Federal de Pelotas. Foram coletadas amostras de seis machos, através da técnica de compressão abdominal. A coleta de sêmen foi realizada no laboratório de ictiologia da mesma instituição. Na sequência o sêmen foi diluído em solução diluidora Beltsville Thawing Solution (BTS) que foi preparada de forma a apresentar diferentes osmolaridades: 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400.

As amostras de sêmen foram diluídas com BTS, mantidas sob refrigeração, posteriormente ativadas e submetidas à análise. A análise de motilidade espermática foi realizada através do sistema CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) onde se avaliou a porcentagem de espermatozoides móveis, padrões de motilidade e o tempo pela qual esta se manifestou. Todas as análises foram realizadas nas horas 0, 24, 48 e 72 horas. Os dados presentes nesse trabalho são parciais e se referem apenas aos resultados obtidos em 72 horas.

A análise estatística foi realizada através da análise ANOVA pelo software Statistx.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O zebrafish, um peixe de água doce pertencente à família *Cyprinidae* (ENGESZER *et al.*, 2007), possui uma peculiaridade notável: seus espermatozoides permanecem imóveis no trato reprodutivo e só são ativados quando expostos a um ambiente aquoso hipotônico (ALAVI; COSSON; 2006). Esta ativação, em grande medida, é desencadeada pela diferença de osmolaridade do meio externo, que sinaliza o início da movimentação espermática (RODRIGUES, 2020).

Pesquisas recentes apontam que, durante a coleta de sêmen em zebrafish e em outros peixes de água doce de porte pequeno, frequentemente há contaminação do ejaculado com urina (MATTHEWS *et al.*, 2018; CHENG, *et al.*, 2021). Esta contaminação pode desencadear uma ativação espermática prematura devido à osmolaridade reduzida da urina (CHENG, *et al.*, 2021).

Para contornar este problema e prevenir a ativação precoce, o sêmen é frequentemente combinado com soluções diluidoras de alta osmolaridade. Esta prática visa manter os espermatozoides em estado de inércia até o momento oportuno para sua ativação (CHENG, *et al.*, 2021).

Contudo, a osmolaridade precisa para garantir a integridade e viabilidade das amostras pode variar conforme a espécie em questão. Nosso experimento teve como meta determinar a osmolaridade ideal da solução diluidora BTS para preservar a imobilidade dos espermatozoides de *Danio rerio*, ao mesmo tempo em que assegura a otimização dos parâmetros espermáticos após sua ativação.

Nossos resultados mostraram que, depois de 72 horas sob refrigeração, as soluções de BTS com osmolaridades na faixa de 300 a 350 mOsm/kg se destacaram positivamente, conforme pode ser observado na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1. Motilidade frente à diferentes osmolaridades ao longo do tempo.

| TEMPO/<br>segundos | TRATAMENTO                 |                           |                            |                           |                             |
|--------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
|                    | 200                        | 250                       | 300                        | 350                       | 400                         |
| 10                 | 52,00 ± 7,34 <sup>C</sup>  | 78,60 ± 6,74 <sup>B</sup> | 92,60 ± 2,29 <sup>A</sup>  | 95,60 ± 0,60 <sup>A</sup> | 92,00 ± 2,00 <sup>AB</sup>  |
| 20                 | 33,00 ± 10,90 <sup>C</sup> | 69,00 ± 8,71 <sup>B</sup> | 88,00 ± 2,54 <sup>AB</sup> | 94,00 ± 1,00 <sup>A</sup> | 84,00 ± 4,84 <sup>AB</sup>  |
| 40                 | 18,00 ± 3,47 <sup>D</sup>  | 42,00 ± 8,60 <sup>C</sup> | 48,00 ± 6,63 <sup>BC</sup> | 82,00 ± 3,74 <sup>A</sup> | 67,00 ± 11,57 <sup>AB</sup> |
| 60                 | 00,00                      | 16,00 ± 8,12 <sup>B</sup> | 38,00 ± 8,60 <sup>A</sup>  | 50,00 ± 7,07 <sup>A</sup> | 36,00 ± 2,44 <sup>A</sup>   |
| 80                 | 00,00                      | 00,00                     | 20,00 ± 8,36 <sup>A</sup>  | 26,00 ± 8,12 <sup>A</sup> | 10,00 ± 6,32 <sup>AB</sup>  |
| 100                | 00,00                      | 00,00                     | 4,00 ± 4,00 <sup>AB</sup>  | 10,00 ± 6,32 <sup>A</sup> | 00,00                       |

Letras diferentes na linha demonstram diferença estatística.

Em estudo feito por JING, *et al.* (2009), com sêmen de zebrafish, encontrou melhor motilidade (92 ± 3%) usando solução diluidora contendo 300mOsm/kg, o que corrobora com os dados encontrados no presente estudo. Já em trabalho realizado por CHENG, *et al.* (2021), o melhor desempenho na motilidade (82,5 ± 1,3) se deu através de solução contendo 400mOsm/kg. Os resultados encontrados na bibliografia variam, em grande parte devido ao fato de ser uma espécie que necessita de maiores estudos, mas também devido à variedade de diluentes utilizados.

#### 4. CONCLUSÕES

As soluções diluidoras BTS que obtiveram melhor resultado de motilidade no peixe *Danio rerio*, foram as que apresentavam osmolaridade entre 300 a 350mOsm/kg.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAVI, S. M; COSSON, J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. **Cell Biology International**, London, v. 30, n. 1, p. 1-14, 2006.

CHENG, Y. *et.al.* Optimization of Sperm Management and Fertilization in Zebrafish (*Danio rerio*). **Animals**, Republica Tcheca, v.11, n.6, 2021.

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.

FELIZARDO, V.O. *et al.* Osmolaridade e taxa de diluição na ativação do sêmen criopreservado de *Prochilodus lineatus*. **Archivos de zootecnia**, Córdoba, v.60, n.232, 2011.

GODINHO, H. P. Criopreservação de sêmen de peixes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.21, n.203, p 6-20, 2000.

JING, R. *et al.* Optimization of activation, collection, dilution, and storage methods for zebrafish sperm. **Aquaculture**, v. 290, n. 1, p. 165-171, 2009.

MATTHEWS, J, L. *et al.* Changes to Extender, Cryoprotective Medium, and In Vitro Fertilization Improve Zebrafish Sperm Cryopreservation. **Zebrafish**, Larchmont, v.15, n.3, p. 279-290, 2018.

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

RODRIGUES, R.B. **Criopreservação de sêmen de zebrafish**. 2020.Tese (Doutorado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SHIMODA, E. *et al.* Efeitos da osmolaridade sobre a motilidade espermática na Piabanha *Brycon insignis*. **Revista Ceres**, v. 54, n. 315, p.430-433, 2007.