

Impacto da Elevação da Temperatura da Água em Espermatozoides de *Danio rerio* (F. Hamilton, 1822) (Cypriniformes: Cyprinidae)

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) – corcincd@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As projeções do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC, 2023) indicam um aumento substancial da temperatura global média, com consequências drásticas para os ecossistemas. A elevação das temperaturas máximas e mínimas, especialmente em corpos d'água, representa uma ameaça significativa para a fauna aquática, em particular para espécies ectotérmicas como os peixes (LIBONATI et al., 2022).

A reprodução dos peixes é um processo complexo e sensível a variações ambientais. Muitas espécies apresentam fecundação externa, liberando gametas na água (COSSON, 2004), uma vez que os espermatozoides são ativados somente quando entram em contato com um meio aquoso de baixa osmolalidade (LAHNSTEINER & PATZNER, 2008). A viabilidade dos espermatozoides nesses casos é crucial para o sucesso reprodutivo e é influenciada por diversos fatores, incluindo a temperatura.

O zebrafish (*Danio rerio*), um pequeno peixe tropical da família Cyprinidae, tem sido um organismo modelo de eleição em diversos estudos biológicos (LAWRENCE, 2007). Seus atributos como organismo modelo, como desenvolvimento rápido, genoma bem caracterizado e fácil manipulação genética, contribuíram para sua ampla utilização em pesquisas que abrangem desde a biologia do desenvolvimento até a modelagem de doenças humanas.

Assim, neste trabalho, foi estudada o impacto da temperatura da água na reprodução de *Danio rerio*, mais conhecido como zebrafish.

2. METODOLOGIA

Neste trabalho, foram utilizados peixes da espécie *Danio rerio*, ou Zebrafish, machos com maturidade reprodutiva completa, em vista de evitar efeitos da intensa variação hormonal que ocorre durante a maturação. Esses peixes foram obtidos do biotério de Ictiologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), no campus Capão do Leão.

Para avaliar os efeitos da temperatura sobre a qualidade espermática de *Danio rerio*, o sêmen foi submetido a diferentes tratamentos térmicos: 20°C (controle), 17°C, 25°C, 28°C e 30°C. A fim de manter a viabilidade espermática durante o experimento, o sêmen foi diluído em Beltsville Thawing Solution (BTS) a 7,2 de pH e 330 mOsm/kg, na proporção de 1:9 (v/v). A temperatura tanto da mistura sêmen-BTS quanto da água utilizada para a ativação dos espermatozoides foi controlada de acordo com cada tratamento. Amostras foram coletadas de cada macho, para posteriormente serem misturadas, criando um pool. Essas alíquotas mixadas foram então divididas entre os cinco tratamentos térmicos.

Após a exposição térmica, os espermatozoides, ainda diluídos em BTS, foram submetidos a análise de citometria de fluxo utilizando um citômetro de fluxo

acústico Attune® (Applied Biosystems) - CASA. Durante a análise, foram medidos os seguintes parâmetros: ruptura da membrana (Rupture), integridade do DNA. Para identificar a população de espermatozoides, eventos não espermáticos foram excluídos utilizando gráficos de dispersão FSC x SSC (PETRUNKINA et al, 2005; PIEHLER et al, 2005). Além disso, para remover detritos da análise, as células foram coradas com Hoechst 33342 em uma concentração de 16,2 mM (Sigma-Aldrich Co. - St. Louis, MO, USA). No entanto, o índice de fragmentação do DNA não foi submetido a esse processo de remoção de detritos. O software utilizado para realizar a análise foi o Cytometric Attune Software V2.1.

Foi feito o teste da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, e uma posterior 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 citometria de fluxo, são as dependentes. O software Statistix 2010 foi utilizado. O valor de $p < 0,05$ foi considerado para as diferenças significativas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise estatística dos dados obtidos na citometria de fluxo revelou que a ruptura da membrana foi significativamente maior em espermatozoides expostos a 28 °C ($25,862 \pm 4,93\%$) em comparação com aqueles expostos a 25 °C ($14,016 \pm 1,22\%$). No entanto, não houve diferenças significativas em relação aos outros tratamentos térmicos (Fig. 1A). A integridade do DNA diminuiu a 20 °C ($50,237 \pm 0,11\%$) e 28°C ($50,044 \pm 0,02\%$), em comparação com 17°C ($51,284 \pm 0,64\%$) (Fig. 1B). Contudo, quando expostos à 25 e 30 °C, esse dano não diferiu estatisticamente dos outros tratamentos.

Os resultados deste estudo corroboram os achados de LAHNSTEINER & LEITNER (2013), demonstrando que temperaturas elevadas podem causar danos significativos ao DNA e comprometer a qualidade espermática em geral. Nossos dados indicam que, em espermatozoides de *Danio rerio*, a partir de 25 °C, a viabilidade da membrana é fortemente prejudicada, e que a partir de 20 °C a integridade do DNA começam a declinar. Ainda, temperaturas elevadas, aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), pela elevação do metabolismo (SU ET AL., 2019; DADRAS ET AL., 2019). O excesso de ROS sobrecarrega as defesas antioxidantes do espermatozoide, elevando o estresse oxidativo e danificando a membrana celular, comprometendo, por exemplo, a motilidade (GIBB & AITKEN, 2016) e a integridade de lipídios e proteínas (SHALIUTINA ET AL., 2013). Esses danos, tanto em espermatozoides móveis quanto quiescentes (DADRAS ET AL., 2019), podem levar à perda da função espermática. Dessa forma, os espermatozoides com danos na membrana celular e no DNA provavelmente sofreram com altos níveis de ROS em seu citoplasma, sobrepondo as defesas antioxidantes.

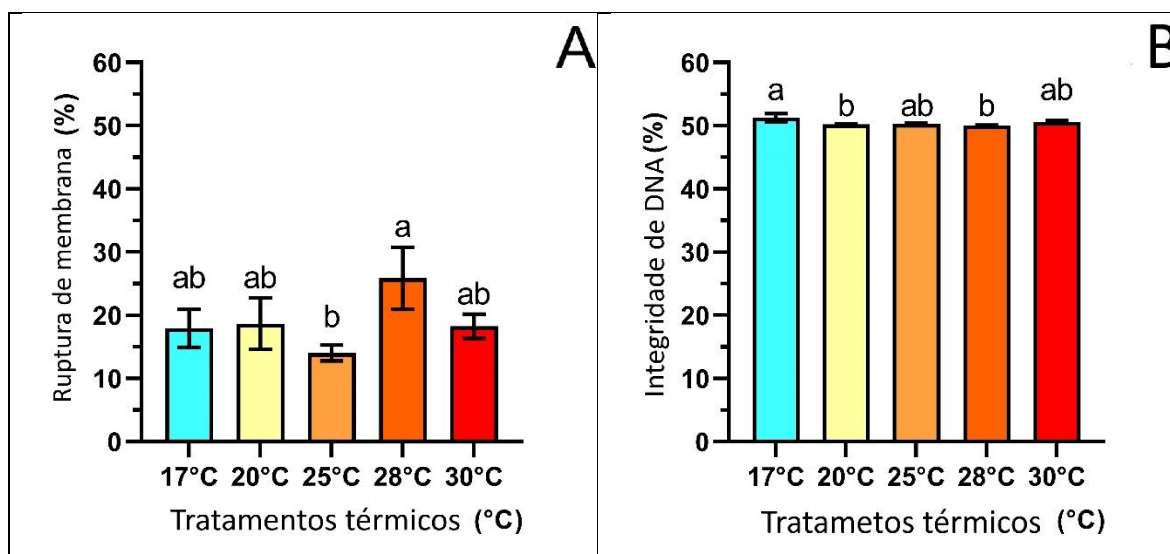


Figura 1: Citometria de fluxo em esperma de *Danio rerio*, após a exposição aos tratamentos térmicos 17, 20, 25, 28 e 30°C. Os dados estão representados em média \pm erro Padrão. Em (A) Ruptura de Membrana (%) e (B) Integridade de DNA. Diferentes letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

4. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstram que o aumento da temperatura compromete significativamente a qualidade espermática de *Danio rerio*, podendo afetar negativamente sua fertilidade.

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.
- COSSON, M. Sperm motility in fishes. **Theriogenology**, v. 62, n. 1, p. 1-14, 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.
- DADRAS H, DZYUBA V, COSSON J, GOLPOUR A, DZYUBA B. The in vitro effect of temperature on motility and antioxidant response of common carp *Cyprinus carpio* spermatozoa. **Journal of Thermal Biology**, 59:64-68, 2019. doi:10.1016/j.jtherbio.2016.05.003
- GIBB Z., AITKEN R.J. The impact of sperm metabolism during in vitro storage: the stallion as a model. **Biomed Research International**. 2016:9380609. doi:10.1155/2016/9380609
- 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. **Environmental Research Letters**, v. 17, n. 1, 015005, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ac462e>.
- IPCC: Climate Change 2023: **Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Edição: Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.). Local: IPCC, Geneva, Switzerland. Páginas: pp. 35-115, 2023. DOI: doi: 10.59327/IPCC/AR6-9789291691647.

- PETRUNKINA, A.M., VOLKER, G., WEITZE, K.F., BEYERBACH, M., TÖPFEN-PETERSEN, E., WABERSKI, D. Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions. **Theriogenology**. 63, 2278-2299, 2005. [http://dx. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.10.008](http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.10.008)
- PIEHLER, E., PETRUNKINA, A.M., EKHLASI-HUNDRIESER, M., TÖPFER-PETERSEN, E. Dynamic quantification of the tyrosine phosphorylation of the sperm surface proteins during capacitation in vitro. **Cytometry A**, 69, 1062–70, 2006. [http://dx. doi: 10.1002 / cyto.a.20338](http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20338)
- SHALIUTINA A, HULAK M, GAZO I, LINHARTOVA P, LINHART O. Effect of short-term storage on quality parameters, DNA integrity, and oxidative stress in Russian (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Siberian (*Acipenser baerii*) sturgeon sperm. **Animal Reproduction Science**, 139(1-4):127-135, 2013. [doi:10.1016/j.anireprosci.2013.03.006](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.03.006)
- SU, L. J., ZHANG, J. H., GOMEZ, H., MURUGAN, R., HONG, X., XU, D., JIANG, F., & PENG, Z. Y. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2019, 5080843. <https://doi.org/10.1155/2019/5080843>
- VARELA JUNIOR, A. S. et al. Methods of cryopreservation of Tambaqui semen, *Colossoma macropomum*. **Animal Reproduction Science**, v. 157, p. 71-77, 2015. [doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.03.017](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.03.017).