

## **EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE CHUMBO NO SISTEMA REPRODUTIVO EM *CHRYSOMUS RUFICAPULUS***

**MATHEUS PIOVESAN<sup>1</sup>; DANUSA LEIDENS; ANTONIO SERGIO VARELA JUNIOR<sup>2</sup>; CARINE DAHL CORCINI<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pelotas- UFPel* – matheuspiovesan@hotmail.com

<sup>2</sup>*Instituto de Ciências Biológicas-Universidade Federal de Rio Grande - FURG* - danusaleidens@gmail.com

<sup>3</sup>*Universidade Federal de Pelotas- UFPel* – corcinicd@gmail.com

### **1. INTRODUÇÃO**

Para BROOKS (1997), os efeitos sobre a reprodução causados pelos metais pesados são relevantes, pois estes podem estar relacionados com a agressão às membranas celulares dos gametas e/ou ovos embrionados. ALMEIDA (2001) supõe que metais pesados podem apresentar tal efeito devido seu grande potencial de oxirredução, em função da liberação de radicais livres que contém oxigênio, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ROS). Em situações de grande quantidade de ROS, alguns efeitos prejudiciais à biomolécula podem ocorrer, resultando em dano oxidativo ao DNA, proteínas e lipídios de membrana, assim como alterações nas enzimas antioxidantes (FINKEL & HOLBROOK, 2000; VALAVANIDIS et al., 2006).

As consequências causadas ao organismo pela interação com o chumbo podem afetar o eixo reprodutivo e, em razão disso, anomalias reprodutivas. São vários os efeitos adversos causados pelo chumbo, como; órgãos reprodutivos, sistema endócrino, incluindo alterações na motilidade dos espermatozoides, presença de espermatozoides imaturos, diminuição da espermatogênese, redução da fertilidade, e outras funções dependentes da integridade do sistema reprodutor masculino (GARU et al. 2011).

As aves são sentinelas da exposição do ambiente ao chumbo desta forma a utilização do *Chrysomus ruficapillus* que, espécie de ave silvestre encontrada na América do Sul, pode permitir um melhor conhecimento da contaminação ambiental que o homem está exposto (JARAMILLO & BURKE, 1999).

Este estudo tem o objetivo de entender os efeitos do chumbo sobre o sistema reprodutivo de aves, utilizando o Garibaldi como modelo.

### **2. METODOLOGIA**

Os experimentos deste presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande (licença # 23.116,006225 / 2011-39). Os machos adultos *C. ruficapillus* (massa corporal:  $36,1 \pm 2,79$  g;  $n = 50$ ) foram capturados na natureza durante o período reprodutivo (outubro/2012) utilizando redes de neblina (SISBIO, captura de licença # 30228-1).

Durante o experimento as aves foram mantidas em gaiolas (dois pássaros/ $m^2$ ) e com piso coberto para evitar contaminação ambiental. Gaiolas estavam de acordo com os critérios estabelecidos pela Instrução Normativa Federal 04/2002 emitida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA).

Aleatoriamente as aves foram divididas em três grupos: (1) aves tratadas com uma única injeção intraperitoneal (1 ml) de solução salina (NaCl 0,9%) (grupo controle;  $n = 12$ ); (2) as aves tratadas com uma única injeção intraperitoneal (1 ml)

de solução salina (NaCl a 0,9%) contendo acetato de Pb (50 mg Pb/kg; n = 15); e (3) as aves tratadas com uma única injeção intraperitoneal (1 ml) de solução salina (NaCl a 0,9%) contendo acetato de Pb (100 mg Pb/kg; n = 18).

Após sete dias da administração das doses de acetato de chumbo, as aves foram sacrificadas por deslocamento cervical (Report of the AVMA Panel on Euthanasia, 2007; Recomendações das Resoluções do CFMV).

Para identificar o teor de ROS, as amostras frescas dos testículos foram pesadas e homogeneizadas em tampão fosfato salina (PBS). Após, as amostras foram centrifugadas (10.000x) a 4°C durante 20 min. O sobrenadante foi coletado para a determinação de ROS segundo MYHRE & FONNUM, (2001). A clivagem por esterases celulares do sobrenadante que na presença de ROS gera um fluorocromo que permite que a fluorescência possa ser detectada. Leitura de fluorescência foi realizada a cada 5 min. até 60 min. utilizando um leitor de fluorescência de microplacas. Teor de ROS foi expressa como unidade de fluorescência (FU) por miligrama de proteína no sobrenadante homogeneizado.

Os sobrenadantes obtidos durante a determinação de ROS foram usados para a determinação da capacidade antioxidante contra radicais peroxil (ACAP), que foi avaliada por procedimentos descritos por AMADO et al., (2009). A emissão de fluorescência foi determinada utilizando o leitor de microplacas de fluorescência. As leituras foram realizadas a cada 5 min. até 60 min. As FU foram integradas ao longo do tempo após o ajuste dos dados a uma função polinomial de segunda ordem. Os resultados foram calculados como a diferença na área FU por min. da mesma amostra com e sem ABAP, e em seguida normalizada para a área de ROS sem ABAP (área de fundo). A diferença relativa entre a área ROS com e sem ABAP foi considerado uma medida da capacidade antioxidante. Portanto, a capacidade antioxidante diminui à medida que aumenta a área relativa.

Peroxidação lipídica (LPO) foi determinada utilizando o método FOX conforme HERMES et al., (1995). Este método baseia-se na oxidação de Fe<sup>2+</sup> por hidroperóxidos lipídicos sob pH ácido na presença de laranja de xilenol, que forma um complexo com Fe<sup>3+</sup>. As amostras testiculares foram pesadas, homogeneizadas em metanol a 100% (4°C) e centrifugadas (1000x) a 4°C, durante 5 min. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio pelo espectrofotométrico. Hidroperóxido de cumeno (CHP) foi usado como padrão. Os resultados foram expressos como nanomoles de CHP por grama de tecido molhado.

A análise estatística dos dados foram testadas para a distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk. Todas as variáveis dependentes com distribuição normal foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Todas as análises foram realizadas utilizando o software Statistix 9,0 (Analitical Software, Tallahassee, FL, EUA).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se um aumento significativamente menor ( $P < 0,05$ ) do teor de ROS em aves injetadas com 100mg Pb/kg do que nas aves injetadas com 50mg Pb/kg (Fig.1). Já a ACAP, foi reduzida significativamente ( $P < 0,05$ ) nas aves injetadas com 100mg Pb/kg quando comparado com os do grupo de controle. Um nível de peroxidação lipídica significativamente maior ( $P < 0,05$ ) foi observada em aves injetadas com 100mg Pb/kg quando comparado com as de controle e grupos de 50mg Pb/kg. Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) foi observada entre as aves de controle e aquelas injetadas com 50mg Pb/kg.

No presente estudo, foi observado um aumento dependente da dose de LPO no testículo das aves *C. ruficapillus* expostas a uma única dose de acetato de Pb. Na verdade, os testículos das aves injetadas com 100mg Pb/kg mostraram níveis de LPO significativamente mais elevados do que aqueles do grupo de controle. Este achado aponta claramente o estresse oxidativo induzido por Pb como uma explicação razoável por danos observados nos testículos das aves *C. ruficapillus*, especialmente aquela associada com a integridade da membrana de células de esperma. De fato, a membrana de esperma de aves é rica em ácidos gordos poli-insaturados (PUFA), sendo assim sujeita a LPO na presença de ROS (CEROLINI et al., 2006). A peroxidação dos PUFA na membrana da célula de esperma é uma reação autocatalítica, a qual pode causar disfunção da célula com a perda da integridade da membrana, levando a uma diminuição na capacidade de fertilização de espermatozoides (ALVAREZ & STOREY, 1982). Na verdade, a degradação oxidativa de PUFA tem sido considerada como a principal causa da perda de fluidez da membrana e permeabilidade, induzindo danos às células germinativas e esperma (MISHRA & ACHARYA, 2004).

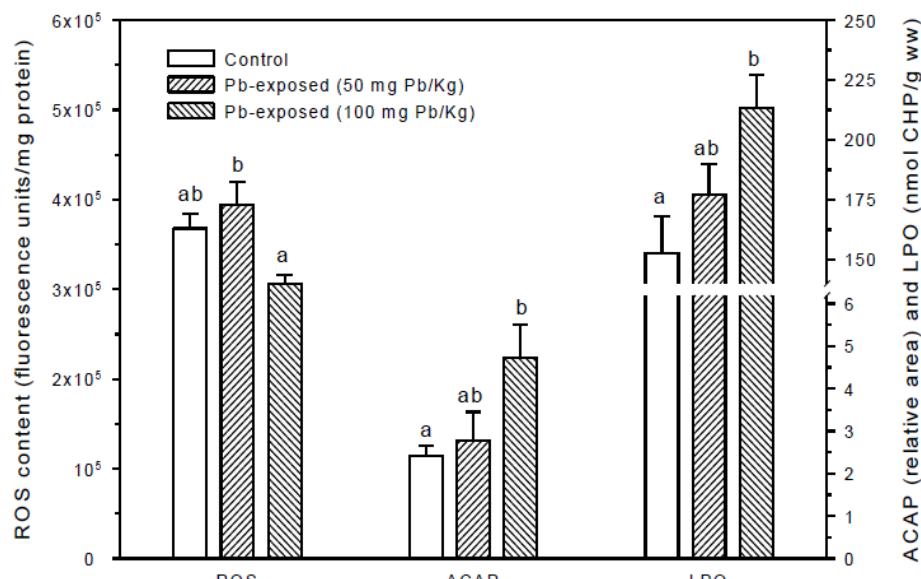


Fig. - 1. Espécies reativas de oxigênio (ROS), capacidade antioxidante total (ACAP), peroxidação lipídica (LPO) em testículos de aves selvagens *Chrysomus ruficapillus* sete dias após a injecção de 1 mL de solução salina (grupo controle) ou 1 ml de solução salina contendo acetato de Pb (50 ou 100mg Pb/kg). Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão (grupo de controle: n = 12; grupos 50 e 100 mg/kg: n = 15). Letras diferentes indicam valores significativos diferentes médios entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ) para cada parâmetro.

#### 4. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos até o momento, pode-se concluir que a exposição crônica ao chumbo pode causar graves danos aos órgãos reprodutivos, o que compromete a integridade dos espermatozoides, e como resultado, a baixa fertilidade dos *C. Ruficapulus*.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.A. et al. The use of oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. **Environment International**, New York, vol.27, n.8, p.673-679, 2001.

ALVAREZ, J.G.; STOREY, B. T. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa. Its effect on sperm motility. **BiolReprod**, vol.27, n.5, p.1102-1108, 1982.

AMADO, L. L.; GARCIA, M. L.; RAMOS, P. B.; FREITAS, R. F.; ZAFALON, B.; FERREIRA, J. L. R. et al. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. **Sci Total Environ**, vol.407, n.6, p.2115-2123, 2009.

BROOKS, S. Egg quality in fish: what makes a good egg?. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, vol.7: n.4, p.387-416, 1997.

CEROLINI, S.; ZANIBONI, L.; MALDJIAN, A.; GLIOZZI, T. Effect of docosahexaenoic acid and  $\alpha$ -tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. **Theriogenology**, vol.66, n.4, p.877-886, 2006.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. **Nature**, v.408, p.239–247, 2000.

GARU, U.; SHARMA, R.; BARBER, I. Effect of lead toxicity on developing testis of mice. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, vol.2, p.2403-2407, 2011.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, G.; STOREY, K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xlenol orange complex formation. **Free Radic Biol Med**, vol.19, n.3 p.271-280, 1995.

JARAMILLO, A.; BURKE, P. New **World blackbirds: The Icterids**. Princeton: Princeton University Press, 1999.

MISHRA, M.; ACHARYA, U. R. Protective action of vitamins on the spermatogenesis in lead treated Swiss mice. **J Trace Elem Med Biol**, vol.18, n. 2, p.173-178, 2004.

MYHRE, O. FONNUM, F. The effect of aliphatic, naphtenic and aromatic hydrocarbons on production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in rat brain synaptosome fraction: the involvement of calcium, nitric oxide synthase, mitochondria and phospholipase A. **Biochemical Pharmacology**, vol.62, n.1, p.119-128, 2001.

PEREIRA, G.C.; EBECKEN, N.F.F. Knowledge discovering for coastal waters classification. **Expert Systems with Applications**, vol.36, n.4, p.8604-8609, 2009.

VALAVANIDIS, T.; VLAHOGIANNI, M.; DASSENAKIS, M.; SCOULOSS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol.64, p.178–189, 2006.