

## CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE *Danio Rerio* EXPOSTAS A TRICAÍNA METANO SULFONATO (MS-222)

MARINA ZANIN<sup>1</sup>; JORDANA DE MOURA DIAS; IZANI BONEL ACOSTA<sup>2</sup>; ANTONIO SERGIO VARELA JUNIOR<sup>2</sup>; MARTIELO IVAN GEHRCKE<sup>2</sup>; CARINE DAHL CORCINI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande – mariinazanin@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – jordanamouradias@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – izanibonel@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – varelajras@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas - martielogehrcke@hotmail.com

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

### 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento das áreas médicas e biológicas cursa com o crescente interesse das instituições na realização de pesquisas, visto que a partir destas torna-se viável a implantação de novas tecnologias na rotina de trabalho. Por esse motivo, é comum a utilização de modelos animais que possibilitem mimetizar experimentos com resultados extrapoláveis à espécie humana. O uso de peixes nesses experimentos tem sido valorizado por apresentarem a complexidade de um vertebrado, permitindo a extração dos resultados para outros animais já que, de modo geral, apresentam algumas semelhanças em sua fisiologia quando comparados com outras espécies de animais (SCHMIDT-NIELSEN, 2002). O interesse científico na espécie *Danio rerio* como modelo se deve por várias características, como a elevada homologia genética com humanos, sucesso reprodutivo, e transparência de embriões e larva, além do seu rápido desenvolvimento.

Para que os procedimentos científicos desejados sejam realizados de maneira adequada, por vezes esses animais são anestesiados, no intuito de que seu manejo se torne mais fácil e cause menos estresse e desconforto. Entretanto, essa anestesia ocorre, normalmente, em um banho de água onde há o risco de sobredosagem, e sem cuidados acerca de efeitos adversos que pode vir a causar. Tendo em vista a escassez de pesquisas dessa natureza, demonstrando a irresponsabilidade na falta de preocupação da sociedade científica com as possíveis interferências desse procedimento nos seus resultados, é evidente a importância da realização de trabalhos que busquem evidenciar as possíveis interferências de procedimentos anestésicos em experimentos com peixes.

Entre os anestésicos existentes, o mais utilizado na aquicultura é a Tricaina Metano Sulfonato (MS-222), que é o único anestésico liberado para o uso em peixes destinados ao consumo humano pelo FDA (Food and Drug Administration) (ROSS&ROSS, 2008). Muito embora seu uso seja comum, os efeitos desse anestésico na reprodução de peixes ainda é incerto; esta situação caracteriza um problema importante, visto que a viabilidade reprodutiva desses animais influencia diretamente na manutenção das proles, sejam elas de objetivo científico ou comercial.

A partir disso, considerando a utilização dessa substância e a importância da reprodução na aquicultura, o presente trabalho tem como objetivo determinar os efeitos da exposição aguda ao anestésico MS-222 nas células espermáticas de *Danio rerio*.

## 2. METODOLOGIA

O presente experimento foi realizado no laboratório do Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Reprodução Animal (REPROPel) da Universidade Federal de Pelotas - UFPel. O modelo experimental utilizado foi o peixe *Danio rerio*. Os animais encontravam-se acondicionados em caixas plásticas contendo água potável, devidamente desclorada, com aeração constante, temperatura de  $23 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ , salinidade  $\geq 0,5$  (água doce), e alimentados com ração comercial, uma vez ao dia. Os parâmetros físicos e químicos da água como dureza, pH, alcalinidade e salinidade foram medidos antes dos tratamentos e mantidos constantes. (Aprovado no CEEA número 7836-2017).

Para a realização da pesquisa aqui relatada, foi utilizado o anestésico MS-222 (tricaina metano sulfonato), com três concentrações diferentes, de 50mg/L, 200mg/L e 500mg/L, além de um grupo controle, sem exposição ao anestésico. Foram utilizados cinco machos para cada tratamento. As concentrações foram definidas com base em literatura previamente consultada, onde evidenciava-se variação de 20 a 480mg/L, sendo que as doses mais comumente utilizadas para anestesia adequada eram de cerca de 150 a 200mg/L (CARTER, 2011; VARGAS, 2018).

Os animais foram imersos em um litro de água adicionado das concentrações pré-estabelecidas do anestésico, e permaneceram até que perdessem o equilíbrio, e cessassem quaisquer movimentos corporais e operculares. Em seguida, realizou-se secção da medula espinhal na região cervical para eutanásia dos mesmos, seguida da retirada das gônadas.

Coletado o conteúdo espermático do interior das gônadas, foram realizadas análises espermáticas utilizando o sistema computadorizado CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). Para cada amostra coletada foram colocados 3  $\mu\text{L}$  de sêmen em lâmina própria para leitura, na qual foram selecionados cinco campos para análise. A mensuração da cinética espermática foi feita através da avaliação de diversos parâmetros, sendo que os abordados no presente trabalho são os de motilidade total (MT), e motilidade progressiva (MP), em porcentagem, e período de motilidade. Foi realizada análise de comparação das médias pelo método ANOVA no software Statistix.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Procedimentos experimentais realizados com peixes resultam na exposição desses animais a diversos estressores, podendo causar alterações fisiológicas e comportamentais que levem a resultados insatisfatórios (BARTON, 2000). Diante disso, anestésicos como a tricaina metano sulfonato (MS-222) são utilizados para reduzir os prejuízos oriundos do estresse nesses animais. Entretanto, assim como deve-se determinar a concentração ideal a ser utilizada para que os planos anestésicos sejam atingidos (ROUBACH & GOMES, 2001), é imprescindível que testes toxicológicos sejam realizados para estabelecer limites aceitáveis de exposição, bem como determinar possíveis efeitos tóxicos dessas substâncias nos peixes expostos.

Considerando-se o anestésico MS-222 e sua interferência sobre os parâmetros reprodutivos de peixes, os estudos são escassos. Muito embora PIPER e colaboradores (1982) tenham observado efeito prejudicial desta substância na viabilidade de ovos de peixe, não encontra-se na literatura informações concretas de cunho reprodutivo, principalmente acerca do material espermático. No presente

experimento, após analisar os valores de motilidade total e motilidade progressiva do material espermático de *Danio rerio* exposto à tricaina, é possível evidenciar o aumento em ambos os valores (tabela 1). Concomitantemente, foi possível identificar que, muito embora no primeiro momento a motilidades dessas células espermáticas tenha aumentado, o período de motilidade reduziu nos grupos de exposição. Apesar da literatura escassa, essa informação corrobora WAGNER et al. (2002), o qual demonstrou o MS-222 como causa de redução no período de motilidade em células espermáticas de truta-arcoíris expostas diretamente ao anestésico.

**Tabela 1.** Valores de motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) das células espermáticas de *Danio rerio* expostas a três diferentes concentrações de MS-222.

	Controle	50mg/L Tricaina	200mg/L Tricaina	500mg/L Tricaina
MT	29,7 ± 1,1 <sup>b</sup>	39,0 ± 2,3 <sup>a</sup>	41,8 ± 2,2 <sup>a</sup>	36,5 ± 1,9 <sup>a</sup>
MP	23,1 ± 1,0 <sup>b</sup>	34,3 ± 2,4 <sup>a</sup>	37,2 ± 2,3 <sup>a</sup>	31,8 ± 1,6 <sup>a</sup>

**Tabela 2.** Período de motilidade das células espermáticas de *Danio rerio* expostas a três diferentes concentrações de MS-222.

Tratamento	Período de Motilidade
Controle	171,80± 16,2 <sup>a</sup>
50mg/L Tricaina	89,600± 18,9 <sup>b</sup>
200mg/L Tricaina	135,60± 17,9 <sup>ab</sup>
500mg/L Tricaina	109,40± 17,4 <sup>b</sup>

É sabido que os anestésicos de modo geral, incluindo o MS-222, caracterizam compostos tóxicos e, por esse motivo, levam as células a aumentarem seu metabolismo no intuito de acelerar a metabolização e eliminação do mesmo. Além disso, são causadores de danos oxidativos por conta do aumento na formação das chamadas espécies reativas de oxigênio (EROS); a enzima glutationa-s-transferase é um exemplo de mecanismo de detoxificação que apresenta metabolismo aumentado nessas situações (POPOVIC et al., 2012). A partir disso é possível inferir que o precoce aumento na motilidade total e progressiva observado nas células espermáticas do presente experimento retrata o metabolismo acelerado no qual estas encontram-se frente a um agente agressor.

Entretanto, ao passo em que as reservas energéticas e quantidade de ATP (trifosfato de adenosina) decaem por conta dessa superativação de mecanismos detoxificantes, o período de motilidade da célula espermática tende a se tornar mais curto, justificando os valores da segunda tabela apresentada. Além disso, outra ação inibitória mais tardia do anestésico MS-222 sobre os espermatozoides pode ser explicada pela presença de receptores do neurotransmissor gama-aminobutírico (GABA) nestas células, uma vez que anestésicos, de modo geral, atuam nas vias inibitórias do organismo através da via deste neurotransmissor (CALOGERO et al., 1999).

Progressivamente, a quantidade de energia disponível na célula reduz, ao passo em que a ação do anestésico através do GAMA se intensifica. Além disso, a produção elevada de espécies reativas de oxigênio leva a célula espermática a um estado cada vez mais grave de estresse oxidativo. Nestas situações, modificações patofisiológicas passam a ocorrer nos espermatozoides, caracterizando um ciclo deletério que culmina no prejuízo irrefutável às células espermáticas (WANG et al., 2003).

#### 4. CONCLUSÕES

Conclui-se, portanto, a partir do presente trabalho, que a exposição aguda ao anestésico MS-222, corriqueiramente utilizado na aquicultura, pode culminar em efeitos prejudiciais às células espermáticas de *Danio rerio*, por meio da redução do seu período de motilidade, podendo interferir negativamente na vida reprodutiva desses peixes e no resultado de pesquisas desenvolvidas com esse modelo experimental; apesar disso, maiores estudos são necessários para elucidar possíveis alterações fisiológicas e funcionais da célula.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTON, B. A., et al. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. **N. Am. J. Aquacult.** 62:12-18. 2000.
- CALOGERO, A.E.; BURRELLO, N.; FERRARA, E.; HALL, J.; FISHEL, S.; D'AGATA, R. Gammaaminobutyric acid (GABA) A and B receptors mediate the stimulatory effects of GABA on the human sperm acrosome reaction: interaction with progesterone. **Fertil Steril.** 71:930-6. 1999.
- CARTER, K.M. et al. A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish. **Rev Fish Biol Fisheries.** 21:51–59. 2011.
- PIPER, R.G., et al. Fish Hatchery Management. **US Fish and Wildlife Service**, Washington DC. 1982.
- ROSS, L.G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals.** 3.ed. Oxford: Blackwell Science, 2008. 240p.
- ROUBACH, R.; GOMES, L.C. O uso de anestésicos durante o manejo de peixes. **Panorama Aqüicultura,** 11:37-40. 2001.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. 2002. **Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente.** 5 ed. Santos Livraria Editora, São Paulo.
- POPOVIC, N.T.; STRUNJAK-PEROVIC, I.; COZ-RAKOVAC, R.; BARISIC, J.; JADAN, M.; BERAKOVIC, A.P.; KLOBUCAR, R.S. Tricaine methane-sulfonate (MS-222) application in fish anaesthesia. **J. Appl. Ichthyol.** 28, 553–564. 2012.
- VARGAS, R.A. Anesthesiology, Anesthetics and Zebrafish (*Danio Rerio*). An Animal Model to Perform Basic Biomedical Research. **EC Anaesthesia** 4.6. 202-213. 2018.
- WAGNER, E. et al. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. **Aquaculture.** 211, 353–366, 2002.
- WANG, X; SHARMA, R.K.; GUPTA, A; GEORGE, V.; THOMAS, A.J.; FALCONE, T.; AGARWAL, A. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. **Fertil Steril**, v.80, suppl.2, p.844-850, 2003.