

PROPOFOL: EFEITO NAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE MACHOS ADULTOS DE *DANIO RERIO*

JORDANA DE MOURA DIAS¹; IZANI BONEL ACOSTA²; STELA MARI MENEGHELLO GHELLER³, MARINA ZANIN⁴; RAFAEL MIELKE BARBOSA⁵; CARINE DAHL CORCINI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas (UFPel) - jordanamouradias@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas (UFPel) - izanibonel@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas (UFPel) - stelagheller@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas (UFPel) - mariinazanin@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas (UFPel) - rafaelmielkeb@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas (UFPel) - corcinicd@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A utilização de animais em pesquisas científicas é uma prática ainda muito utilizada, porém representa grandes polêmicas e discussões no debate bioético uma vez que existe a constante preocupação com bem estar desses animais (CÂMARA E SILVA, 2011). Dentre os peixes mais utilizados para pesquisas científicas está a espécie *Danio rerio* (zebrafish) em decorrência de algumas características como: semelhança com a genética humana, alta prolificidade, rápido desenvolvimento, transparência de embriões e larvas, tamanho diminuto (3 a 4 cm quando adulto) facilitando a manipulação (SPENCE et al., 2007).

A anestesia é um procedimento rotineiro e indispensável nos sistemas de piscicultura e pesquisa, devendo ser realizado da maneira mais eficiente possível, tanto do ponto de vista biológico, quanto econômico, visando anestesiá os peixes facilitando manejo geral com o intuito de evitar sofrimento e dor sem causar nenhum dano no crescimento e na reprodução (ROUBACH E GOMES, 2001). Peixes pequenos, como *Danio rerio*, são normalmente anestesiados por imersão na água, podendo ocorrer risco de sobre dosagem, necessitando assim, do desenvolvimento de melhores protocolos anestésicos para aperfeiçoar o uso desses modelos em diferentes situações experimentais mantendo o bem estar animal.

Embora já existam trabalhos verificando o efeito de anestésicos sobre a reprodução de peixes, pouco se sabe dos efeitos do anestésico Propofol nas células espermáticas da espécie *Danio rerio* uma vez que esse anestésico é mais utilizado em mamíferos. Em vista disso o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito agudo do anestésico Propofol na cinética das células espermáticas de machos adultos 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, sendo que todos os procedimentos foram realizados sob licença do Conselho Nacional de Experimentação Animal (7836-2017). Os animais estavam acondicionados em caixas plásticas contendo água potável, devidamente descolorada, 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, e os parâmetros físicos e químicos da água como dureza, pH, alcalinidade e salinidade foram medidos antes dos tratamentos e mantidos constantes.

O experimento foi realizado utilizando o anestésico Propofol nas concentrações de 150 e 200 ml/L e um tratamento utilizado como controle onde foi realizada a eutanásia por secção da medula espinhal na região cervical. Para esse experimento foram utilizados cinco machos da espécie *Danio Rerio* para cada tratamento, primeiramente os animais foram imersos em um litro de água adicionado das concentrações pré-estabelecidas do anestésico até que os animais ficassem totalmente anestesiados e parassem de se movimentar, após isso realizou-se a secção da medula espinhal na região cervical causando a morte do animal para posterior retirada das gônadas.

Após coletar o conteúdo espermático do interior das gônadas, foram realizadas análises espermáticas utilizando o sistema computadorizado CASA (Computer-assisted Sperm Analysis). A mensuração da cinética espermática foi feita através da avaliação da motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP), em porcentagem, média da distância percorrida (DAP), média da distância em linha curva (DCL), média da distância retilínea (DSL), dada em micrômetros, velocidade média do caminho, $\mu\text{m} / \text{s}$ (VAP), Velocidade Curvilínea (VCL) e velocidade retilínea (VSL), em micrômetros por segundo, Retidão, VSL / VAP, % (STR), linearidade (LIN), oscilação, VAP / VCL, % (WOB), Amplitude da Cabeça Lateral (ALH), Freqüência Cruzada da Frequência (BCF) e velocidade curvilínea (VCL). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando Statistix software 9.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para garantir o bem-estar dos peixes que são submetidos aos mais diversos procedimentos sejam os mais altos padrões, faz-se o uso de anestésicos com o intuito de amenizar o sofrimento durante o manuseio. No entanto poucas informações estão disponíveis para facilitar a escolha do melhor anestésico, apesar dos mais de 100 anos de uso e do grande número de peixes espalhados em laboratórios em todo o mundo atualmente (READMAN et al., 2017).

O sucesso reprodutivo tanto em aquiculturas como em experimentos é fundamental que se controle todos os fatores que possam de alguma forma prejudicar a qualidade dos gametas, pois suas propriedades intactas são indispensáveis para garantir a excelência na produção de descendentes, sendo uma das principais análises os parâmetros espermatéricos como a cinética da motilidade. Nossa estudo demonstrou que o período de motilidade teve diferença estatística entre os tratamentos, sendo o tempo de motilidade maior no controle (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito de diferentes concentrações de Propofol em amostras de sêmen de zebrafish (*Danio rerio*) sob parâmetro de período de motilidade, resultados expressos em porcentagem (média ± desvio padrão da média).

Tratamento	Período de Motilidade (s)
Controle	171,80± 16,2 ^A
150 ml/L Propofol	124,20± 33,9 ^B
200 ml/L Propofol	109,20± 4,6 ^B

^{a,b} Letras distintas demonstram diferença estatística nas colunas ($P<0.05$).

Alguns trabalhos avaliando tempo de anestesia e de recuperação mostraram que com Propofol rapidamente os peixes perdem o equilíbrio, mas também apresentam uma rápida recuperação (BALKO et al., 2018; VALENTIM et

al., 2016), sendo um bom candidato para experimentos com reprodução, já que a manipulação é rápida para tal procedimento.

Tabela 2. Análise dos parâmetros cinéticos sob influência do anestésico Propofol. Os dados estão expressos em média e erro padrão da média.

	Controle	150 mL/L Propofol	200 mL/L Propofol
Mottotal	29,7 ± 1,1 ^B	39,5 ± 2,1 ^A	43,2 ± 2,6 ^A
motpro	23,1 ± 1,0 ^B	33,7 ± 2,1 ^A	35,8 ± 2,2 ^A
DAP	31,9 ± 1,1 ^A	34,3 ± 1,4 ^A	26,3 ± 1,0 ^B
DCL	35,0 ± 0,9 ^A	36,6 ± 1,3 ^A	29,6 ± 0,9 ^B
DSL	29,6 ± 1,1 ^A	31,8 ± 1,4 ^A	24,7 ± 1,0 ^B
VAP	67,8 ± 2,3 ^A	73,5 ± 3,0 ^A	56,0 ± 2,2 ^B
VCL	74,4 ± 2,0 ^A	78,4 ± 2,9 ^A	62,9 ± 1,1 ^B
VSL	63,0 ± 2,3 ^A	68,2 ± 3,0 ^A	52,6 ± 2,3 ^B
STR	0,9 ± 5,3 ^A	0,9 ± 7,3 ^A	0,9 ± 6,3 ^A
LIN	0,8 ± 0,01 ^A	0,8 ± 0,01 ^A	0,8 ± 0,01 ^A
WOB	0,8 ± 8,6 ^A	0,9 ± 7,7 ^B	0,8 ± 0,01 ^A
ALH	0,9 ± 0,04 ^A	0,8 ± 0,02 ^B	0,9 ± 0,03 ^A
BCF	31,4 ± 0,6 ^A	30,6 ± 0,6 ^{AB}	29,8 ± 0,6 ^B

A,B,C Letras distintas demonstram diferença estatística nas colunas ($P<0.05$).

Nas avaliações cinéticas nossos estudos demonstraram que as concentrações de Propofol foram significativamente melhores que o controle em quase todos os parâmetros. Mais estudos devem ser realizados, pois verificamos que os parâmetros de cinética espermática forma aumentados quando os animais foram expostos, porém o período de motilidade foi menor. Ainda perdemos os padrões da qualidade seminal quando os animais passam pelo processo de pré-anestesia antes da eutanásia.

Não encontramos trabalhos que retém sobre os efeitos desse anestésico sobre parâmetros espermáticos, apenas com embriões. Segundo GUO et al. 2015 a exposição embrionária ao Propofol é neurotóxica causando aumento de apoptoses.

4. CONCLUSÕES

Com os resultados desse estudo podemos concluir que o Propofol alterou positivamente a cinética espermática, porém maiores estudos devem ser realizados com análise de estrutura e morfologia das células, verificando demais alterações.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALKO, J.A., ODA, A., POSNER, L, P. Use of tricaine methanesulfonate or propofol for immersion euthanasia of goldfish (*Carassius auratus*). *J Am Vet Med Assoc.*, 252(12): 1555–1561, 2018. doi.org/10.2460/javma.252.12.1555.

CÂMARA, Carlos Campos; SILVA, Taciana de Melo Fernandes. Ética na utilização de animais. *Revista Centauro* v.2, n.2, p28 - 34, 2011.

GUO, P., HUANG, Z., TAO, T., CHEN, X., ZHANG, W., ZHANG, Y. Zebrafish as a model for studying the developmental neurotoxicity of propofol. **Journal of applied toxicology: JAT.** 2015.

READMAN, G. D., OWEN, S. F., KNOWLES, T. G., MURRELL, J. C. Species specific anaesthetics for fish anaesthesia and euthanasia. **Scientific reports**, v.7, n.1), p:7102, 2017.

ROUBACH, RODRIGO & GOMES, LEVY DE CARVALHO. O USO DE ANESTÉSICOS DURANTE O MANEJO DE PEIXES. **Panorama da Aquicultura**, v:11, n:66, p:37-40. 2001.

SPENCE, R., GERLACH, G., LAWRENCE, C., SMITH, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**. v:83, n:1, p:13-34. 2007.

VALENTIM, A. M., FÉLIX, L. M., CARVALHO, L., DINIZ, E., ANTUNES, L. M. A. New Anaesthetic Protocol for Adult Zebrafish (*Danio rerio*): Propofol Combined with Lidocaine. **PloS one**, 11, 0147747, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0147747.