

EFEITOS DE EFLUENTES DE FRIGORÍFICO NA FUNCIONALIDADE DE MITOCÔNDRIA DA CÉLULA ESPERMÁTICA DE ZEBRAFISH, *Danio rerio*

JULIANA DO PRADO ALVES¹; JOSIÊ S. CALDAS¹; JANAINA C. SILVA¹; ERICO K. CORREA²; MICHEL D. GERBER³; ANTONIO S. V. JUNIOR⁴

¹Universidade Federal do Rio Grande – ju_alvesrg@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas

³Instituto Federal Sul-Rio-grandense

⁴Instituto de Ciências Biológicas

1. INTRODUÇÃO

Efluentes são resíduos complexos e quando liberados no meio ambiente podem atingir altos níveis de poluição. Diversos estudos mostraram que efluentes liberados por fabricas ou indústrias podem afetar o sistema fisiológico de organismos aquáticos (SVENSON et al., 2002; HOEGER et al., 2004; SEPULVEDA et al., 2004) causando diversos efeitos adversos em relação a reprodução de peixes, como a redução da qualidade dos gametas (JOBILING et al., 2002).

O espermatozoide é o gameta responsável por carregar o material genético masculino até o gameta feminino durante a fecundação. Para que esse processo ocorra, é necessário energia para a movimentação da cauda espermática, e a mitocôndria encontrada na parte intermediária do espermatozoide, possui um importante papel na produção dessa energia (ALBERTS, 1997).

O zebrafish (*Danio rerio*) é um peixe utilizado como modelo para estudos devido ao seu alto nível de fecundidade e tempo relativamente rápido entre gerações (BRIGGS, 2002; VAN EEDEN et al., 1999).

Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a funcionalidade de mitocôndria dos espermatozoides de zebrafish (*Danio rerio*) expostos a dois tipos de efluentes – bruto e tratado, de um frigorífico.

2. METODOLOGIA

O experimento foi executado em quatro repetições, com 40 peixes para cada tratamento (n = 120). Foram utilizados três tratamentos, o tratamento controle (água de abastecimento do frigorífico), o efluente bruto e o efluente tratado. Os tratamentos foram coletados de um frigorífico localizado no município de Pelotas, RS.

Os parâmetros mantidos da água dos tratamentos foram de aproximadamente, 23 °C de temperatura, teor de oxigênio dissolvido a cima de 7mg/L, fotoperíodo de 12h/12h e pH entre 6,5 e 7,5. Os tratamentos com efluente bruto e tratado foram diluídos com fator de diluição F=16, ou seja, 6,2%. O tratamento controle foi utilizado sem diluição.

Durante o experimento, os peixes foram expostos nos tratamentos por 96h, em jejum, sem renovação da diluição e com incorporação de oxigênio através de compressor de ar utilizando pedra porosa.

Os peixes foram anestesiados em água a 0 °C e dissecados para a retirada das gônadas masculinas. Estas foram homogeneizadas com diluente *Beltville Thawing Solution* (BTS) para a leitura e avaliação da funcionalidade mitocondrial.

A funcionalidade de mitocôndria foi avaliada com a utilização de sonda específica para mitocôndrias, Rodamina 123 (Rh123), acrescida por Iodeto de

Propídio (IP) para a diferenciação entre os espermatozoides vivos e mortos de acordo com protocolo modificado de Windsore White (1993).

Foram avaliadas um total de 200 células/lâmina através de microscópio de epifluorescência, sendo consideradas mitocôndrias funcionais as células que possuíam peça intermediária com uma intensa fluorescência verde. Já as células com baixa fluorescência verde (foscas), foram consideradas não funcionais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os dados da Tab. 1, pode-se observar que não houve diferença estatística entre o efluente tratado e o controle. Porém, o efluente bruto apontou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos outros dois tratamentos.

Tabela 1 – Média e Desvio Padrão para funcionalidade de mitocôndria (FM) em zebrafish (*D. rerio*) expostos a efluentes.

Tratamento	Funcionalidade de Mitocôndria
Água abastecimento do Frigorífico	63,1 ± 2,8 ^A
Efluente Bruto	32,4 ± 4,2 ^B
Efluente Tratado	56,0 ± 6,07 ^A

*Diferença estatística ($p < 0,05$) representada por letras distintas sobrescritas.

As mitocôndrias são organelas responsáveis, principalmente, pela produção de energia promovendo a movimentação da cauda flagelar do espermatozoide (COSSON, 1996). Logo, a qualidade do efluente interfere diretamente na viabilidade da célula espermática, como demonstrado pela baixa funcionalidade mitocondrial no efluente bruto. Essa diminuição na funcionalidade poderá afetar a biologia reprodutiva da espécie por interferir em parâmetros fundamentais como a motilidade progressiva (BILODEAU et al., 2001).

4. CONCLUSÕES

Os dados obtidos com exemplares de zebrafish (*D. rerio*) expostos durante 96h a uma diluição de 6,2% em diferentes tratamentos mostraram que o efluente tratado do frigorífico encontra-se em boas condições para que a funcionalidade mitocondrial da célula espermática não seja afetada. Além disso, foi comprovado de que resíduos industriais lançados nos ambientes aquáticos causam decréscimo na funcionalidade mitocondrial, podendo interferir na reprodução desses animais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. **Fundamentos da biologia celular: uma introdução a biologia molecular da célula**. Porto Alegre, Brasil, 1997. 3v.

BILODEAU, J. F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, I. C.; SIRARD, M.A. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, Canada, v. 56, p. 275-286, 2001.

BRIGGS, J.P. The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. **American Journal of Physiology**, USA, v. 282, p. 3-9, 2002.

COSSON, J. A. A moving image of flagella: news and views on the mechanism involved in axonemal beating. **Cell Biology International**, France, v. 20, p. 83-94, 1996.

HOEGER, B.; VAN DEN HEUVEL, M. R.; HITZFELT, B. C.; DIETRICH, D. R. Effects of treated sewage effluent on immune function in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, Canada, v. 70, p. 345-355, 2004.

JOBLING, S.; COEY, S.; WHITMORE, J. G.; KIME, D. E.; VAN LOOK, K. J. W.; MCALLISTER, B. G.; BERESFORD, N.; HENSHAW, A. C.; BRIGHTY, G.; TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility. **Biology of Reproduction**, UK, v. 67, p. 515-524, 2002.

SEPULVEDA, M. S.; GALLAGHER, E. P.; WIESER, C. M.; GROSS, T. S. Reproductive and biochemical biomarkers in largemouth bass sampled downstream of a pulp and paper mill in Florida. **Ecotoxicology and Environmental**, USA, v. 57, p. 431-440, 2004.

SVENSON, A.; ORN, S.; ALLARD, A. S.; VIKTOR, T.; PARKKONEN, J.; OLSSON, P. E.; FORLIN, L.; NORRGREN, L. Estrogenicity of domestic and industrial effluents in Sweden. **Aquatic Ecosystem Health & Management**, Suécia v. 5, p. 423-434, 2002.

VAN EEDEN, F. J. M.; GRANATO, M.; ODENTHAL, J.; HAFFTER, P. Developmental mutant screens in the zebrafish. **Methods in Cell Biology**, USA, v. 60, p. 21-41, 1999.

WINDSOR, D.P.; WHITE, I.G. Assessment of ram sperm mitochondrial function by quantitative determination of sperm rhodamine 123 accumulation. **Molecular Reproduction and Development**, Australia, v. 36, p. 354-360, 1993.