

EFEITO DE DIFERENTES EFLUENTES INDUSTRIAIS SOBRE A MEMBRANA ESPERMÁTICA DE *Zebrafish* (*Danio rerio*)

IZANI BONEL ACOSTA¹; JÔSIE S. CALDAS¹; JULIANA P. ALVES¹; ERICO KUNDE CORREA²; MICHEL DAVID GERBER²; CARINE DAHL CORCINI².

¹ Universidade Federal do Rio Grande - FURG (izanibonel@hotmail.com)

² Universidade Federal de Pelotas – UFPEL (corcincd@gmail.com)

1. INTRODUÇÃO

Diversos produtos químicos são capazes de ocasionar danos ao meio ambiente (DEGUCHI et al., 2007). Os principais causadores dessas descargas exacerbadas de substâncias maléficas são as indústrias, as diversas atividades urbanas e agrícolas, e sistemas de tratamento de esgotos (VANZELLA, 2007).

Assim, verifica-se a necessidade de utilização de marcadores biológicos confiáveis para contribuir na identificação da relação causal entre a exposição a contaminantes e o aumento de riscos dos efeitos sobre os indivíduos e as populações, que ocasionam a diminuição da integridade do ecossistema (BOLOGNESIM et al., 2006).

Vários peixes ósseos estão sendo utilizados para estudos de toxicidade ambiental, pois esses organismos acumulam substâncias de dois modos, direto e indireto. Direto pelo consumo ou contato com a água contaminada e indireto pelo consumo de outros organismos contaminados presentes no ambiente (MATSUMOTO et al, 2006).

O *Zebrafish* (*Danio rerio*) é um peixe teleósteo de água doce tropical, nativo da Índia. Ele tem sido amplamente utilizado para testes toxicológicos, farmacêuticos, terapêuticos e mutagênicos, além de estudos de biologia reprodutiva. Dentre as principais características que vem ampliando o uso deste animal como modelo estão: o seu tamanho diminuto (3-5 cm quando adultos), permitindo fácil manipulação e a absorção de substâncias que são adicionadas diretamente na água. (SPENCE et al, 2008).

No que tange a reprodução desses animais, a toxicidade dos contaminantes ambientais pode ocasionar a desestabilização das membranas da célula espermática, devido à reorganização e perda de lipídios, juntamente com a peroxidação lipídica pela ação de espécies reativas de oxigênio. Esses eventos podem afetar funções espermáticas como motilidade, resposta ao estresse osmótico e mecanismos de sinalização, comprometendo a habilidade dos espermatozoides de alcançarem, ligarem e reagirem com o oócito (RICKER, 2006).

Logo, o presente estudo teve como objetivo avaliar a integridade da membrana espermática em *zebrafish* exposto à efluente bruto e efluente tratado oriundos de frigorífico.

2. METODOLOGIA

No presente trabalho foram utilizados um total de 120 animais da espécie *Zebrafish* (*Danio rerio*), sendo 40 machos para cada tratamento em 4 repetições. Os peixes foram mantidos em água natural desclorada, ajustada para pH e dureza exigidos pelo organismo-teste. Os parâmetros mantidos para a espécie em água de cultivo e controle foram de pH entre 6,5 e 7,5, dureza entre 20 a 40mgCaCO₃/L, temperatura aproximada de 23 °C, teor de oxigênio dissolvido

aproximada de 7mg/L e fotoperíodo de 12h luz. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia. O ensaio realizado foi do tipo agudo, com duração de 96h, com incorporação de oxigênio por meio de compressor de ar. O efluente foi coletado no Frigorífico Castro localizado na cidade de Pelotas/RS. Coletou-se água de entrada (Controle), efluente bruto e efluente tratado. Os tratamentos com efluente bruto e tratados foram diluídos com fator de diluição $F=16$, ou seja, 6,2%, os tratamentos com água de entrada foram utilizados sem diluição. Para a análise de qualidade seminal, os animais foram anestesiados a 0°C para coleta das gônadas. A integridade de membrana plasmática foi avaliada pelas sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio, em microscópio de epifluorescência, sendo verdes as células íntegras e vermelhas ou verde/vermelhas as células lesadas de acordo com Harrison & Vickers (1990)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação à integridade de membrana houve diferença estatística entre os animais mantidos em água tratada e com efluente bruto ($P<0,05$), sendo ambos iguais ao efluente tratado.

Tabela 1 – Média e desvio padrão para a integridade de membrana plasmática (IM) de espécies *Zebrafish* (*Danio rerio*) após tratamento com efluentes ($P<0,05$).

| | Água de entrada | Efluente tratado | Efluente bruto |
|----|-----------------|------------------|----------------|
| IM | 60.1 ± 5.2 A | 52.4 ± 6.4 AB | 34.0 ± 7.2 B |

*Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente

A perda da integridade da membrana acarreta em danos funcionais que comprometem a fertilidade do gameta colocando em risco a sobrevivência da espécie. Segundo Villela et al. (2007), estas mudanças resultantes provocarão, evidentemente, efeitos deletérios sobre os organismos que habitam esses ecossistemas. Por isso debatem-se com frequência os meios de avaliação dos danos genéticos em organismos aquáticos que foram expostos a contaminantes. O efluente tratado apresenta similaridade ao efluente bruto demonstrando que talvez aja a necessidade de um tratamento mais elaborado no efluente tratado, permitindo que o mesmo seja liberado de forma mais limpa.

4. CONCLUSÕES

Houve perda na integridade da membrana plasmática nos animais submetidos ao tratamento com efluente bruto com relação ao controle. O efluente tratado embora estatisticamente similar ao grupo de água de entrada também mostrou resultados semelhantes ao efluente bruto, demonstrando que o tratamento realizado no efluente bruto necessita de métodos mais aprimorados para a total descontaminação do efluente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOLOGNESIM C.; PERRONE E.; ROGGIERI P. et al, Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic Toxicology* 78S, S93–S98, 2006.

CBRA. 1998. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2ª Ed. Belo Horizonte: CBRA, 49. Cosson, J., BILLARD, R., CIBERT, C., DRÉANNO, C. Ionic factors regulating the motility of fish sperm in: The Male Gamete. Chapter 16:161-186, 1999

DEGUCHI Y., TOYOIZUMI T., MASUDA S. et al, Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. *Mutat. Res.* 627, 178–185, 2007.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* , v. 88, p.343-352, 1990.

MATSUMOTO S.T.; MANTOVANI M.S.; MALAGUTTI M.I.A. et al, Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Gen and Mol Bio*, 29, 1, 148-158, 2006.

VARELA JUNIOR, A.S.; CORCINI, C.D.; GHELLER, S.M.M.; JARDIM, R.D.; LUCIA, T.JR.; STREIT JR., D.P.; FIGUEIREDO, M.R.C. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Theriogenology* ,v.78, p. 244-251, 2012.

RICKER JV, LINFOR JJ, DELFINO WJ, KYSAR P, SCHOLTZ EL, TABLIN F, et al. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. *Biol Reprod.*;74:359-65; 2006.

SPENCE, R.; GERLACH, G.; LAWRENCE, C., SMITH, C; The behavior and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, v. 83 (1), p. 13-34, 2008

VANZELLA T.P.; MARTINEZ C.B.R.; CÓLUS I.M.S., Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutat. Res.* 631, 36–43, 2007.

VILLELA I.V.; OLIVEIRA I.M., SILVEIRA J.C. et al, Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guayába hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. *Mutat. Res.* 628, 76–86, 2007.