

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS OCASIONADOS PELA ACUMULAÇÃO DE CHUMBO SOBRE AS CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE *Chrysomus ruficapillus*

MARIAH DA SILVEIRA SCHUCH¹; DANUSA LEIDENS²; ANTONIO SERGIO VARELA JUNIOR²; CARINE DAHL CORCINI³

¹ReproPEL, Universidade Federal de Pelotas - UFPel – mariah_schuch@hotmail.com

²Instituto de Ciências Biológicas-Universidade Federal de Rio Grande - FURG -

danusaleidens@gmail.com

varelajras@gmail.com

³ReproPEL, Universidade Federal de Pelotas - UFPel orientadora – corcinicd@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O *Chrysomus ruficapillus* conhecido popularmente como “Garibaldi”, é uma espécie de ave silvestre amplamente distribuída na América do Sul. É comum encontrá-lo em plantações de arroz, visto que esta lhe fornece condições ideais de abrigo, alimento e reprodução (Cirne & López-Iborra 2005). Desta forma, servem como referência no estudo de aves, invertebrados e pequenos mamíferos, o que se tornaria mais difícil em ecossistemas naturais (Beltrame, 2006). Os animais desempenham papel de bioindicadores, pois fornecem avisos de potenciais efeitos adversos para os organismos entre si, para os organismos que atacam sobre eles, e como sentinelas à exposição e à efeitos para os seres humanos (Burger & Gochfeld, 2004). Sendo assim, é de extrema importância desenvolver modelos através de animais silvestres para entender os potenciais riscos ecológicos e como indicadores de riscos para a saúde humana.

Os seres vivos necessitam de pequenas quantidades de metais como o cobre, cobalto e manganês para realização de funções vitais ao organismo, entretanto, altas quantidades são extremamente tóxicas por se tratarem de elementos altamente reativos e de difícil eliminação do organismo. O chumbo é um metal pesado e que constitui um grande problema ambiental em termos de poluição atmosférica, devido a sua emissão por indústrias, navios e por dejetos humanos. Após entrar na cadeia alimentar através do ar, solo e água, pode ocorrer uma bioacumulação em todos organismos, e bioconcentração nos organismos que estão no topo da cadeia alimentar. A exposição ao chumbo pode desencadear problemas hematológicos, neurocomportamentais, nefrotóxicos e reprodutivos (Cory-Slechta et al., 1983; Cory-Slechta, 1990) Os animais silvestres são um modelo indicador dos efeitos à exposição do chumbo em humanos, por apresentarem grandes semelhanças nos efeitos à esta exposição.

Efeitos de metais pesados sobre a reprodução estão relacionados com a agressão às membranas celulares dos gametas e ovos embrionados, provavelmente pelo seu elevado potencial de oxirredução, em função da liberação de radicais livres que contém oxigênio, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ROS) (Almeida, 2001).

Este estudo tem o objetivo de entender os efeitos do chumbo sobre as células espermáticas de aves, utilizando o Garibaldi como modelo.

2. METODOLOGIA

Os experimentos presentes neste estudo foram aprovados pelo Comitê de ética da Universidade Federal do Rio Grande (licença #23116.006225/2011-39), sendo realizados nas Granjas Quatro Irmãos (Joaquim Oliveira) localizada no Km 461 da Estrada BR-471, Rio Grande – Chuí. Foram utilizadas aves silvestres de *Chrysomus ruficapillus* machos adultos. As aves permaneceram em gaiolas, com base de duas aves/m², em piso de terra, tendo vegetação arbustiva e arbórea, com sombreamento e espelho d'água e o comedouro no alto, segundo o Art.22 – Instrução Normativa 04/2002 – IBAMA. Foram utilizados 48 animais, que serão divididos em 3 grupos com 16 animais cada: gaiola 1, fechada com 16 animais, com a administração do metal; gaiola 2, fechada com 16 animais que funcionou como controle, recebendo injeção de salina; 16 aves que foram capturadas com rede de neblina para monitoramento das aves do ambiente (SISBIO, licença de captura #30228-1). Foi administrado através de injeção intraperitoneal uma dose 50 ou de 100mg/kg de acetato de chumbo. As aves foram pesadas e medidas o tamanho total do cúlmen, tarso, causa e asa. Após quinze 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).

As amostras de espermatozoides foram coletadas através dos ductos deferentes, tanto nos animais com a intervenção do chumbo quanto nos animais do controle. Os ductos deferentes foram abertos em solução salina e deixados em temperatura ambiente por 10 min para migração dos espermatozoides para o meio. Os parâmetros de qualidade seminal avaliados logo após a diluição do sêmen foram: integridade da membrana e DNA e funcionalidade mitocondrial.

A integridade de membrana plasmática foi avaliada através das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídio (IP) conforme descrito por Harrison & Vickers (1990). Esta avaliação foi feita em aumento de 400x em microscópio de epifluorescência. As células que apresentavam fluorescência verde foram consideradas íntegras, enquanto as células com fluorescência vermelha e verde/vermelha foram consideradas danificadas.

A integridade do DNA foi avaliada através da sonda acridine, em lâmina seca, em microscópio de epifluorescência sob aumento de 400 x, com excitação em filtro com comprimento de onda de 525 nm. O espermatozoide que emitiu fluorescência verde na cabeça foi classificado como normal (DNA bicatenário) e quando emitiu fluorescência vermelha ou amarela foi classificado como desnaturado (DNA monocatenário).

A funcionalidade mitocondrial foi avaliada com o uso de uma sonda específica, Rodamina 123 (Rh123) (MCLEAN et al. 1993). As células foram avaliadas em aumento de 400x em microscópio de epifluorescência. As células que apresentavam a peça intermediária com uma intensa fluorescência verde foram consideradas com mitocôndrias funcionalmente ativas, enquanto as células sem intensa fluorescência verde na peça intermediária foram consideradas não funcionais. Foi realizada a avaliação de 200 células espermáticas por lâmina nas avaliações de integridade de membrana, integridade de DNA e funcionalidade mitocondrial.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Ocorreu diminuição ($P < 0.05$) na integridade de membrana e funcionalidade mitocondrial espermática nos grupos expostos ao acetato de chumbo (50mg/kg e 100mg/kg) em relação ao controle, entretanto, elas não diferiram entre si ($P > 0.05$).

(Fig.1.). Já, em relação a integridade do DNA do espermatozoide houve diminuição ($P < 0.05$) significativa somente na dose mais alta (100mg/kg) se comparado a dose de 50mg/kg e o grupo controle que não diferiram entre si ($P > 0.05$) (Figura1).

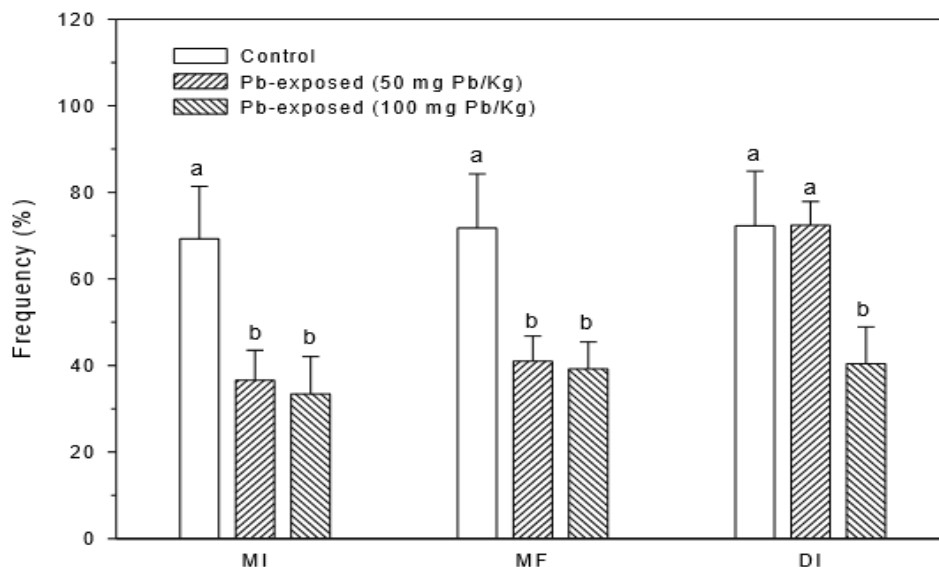


Figura 1- Parâmetros de qualidade espermática na ave *Chrysomus ruficapillus* sete dias após a injeção de 1ml de solução salina (Grupo controle) ou 1 ml de solução salina contendo acetato de chumbo (50 ou 100 mg Pb/kg por grupo). Os dados estão expressos com média \pm erro padrão (Grupo controle $n=12$; Grupos com 50 e 100 mg Pb/Kg $n=15$). MI: Integridade de Membrana; MF: Funcionalidade de Mitocôndria; DI: Integridade do DNA. Letras diferentes demonstram diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos experimentais de cada parâmetro.

Tais resultados podem ser explicados por Hernandez-Ochoa et al. (2006), que constataram que 72% do chumbo é incorporado no núcleo do espermatozoide durante o seu desenvolvimento no testículo, sendo os restantes 28% incorporados durante a sua maturação no epidídimo. Esses autores também observaram que os espermatozoides em camundongos que receberam um tratamento com uma dose mais alta de chumbo apresentaram 60% dos espermatozoides formados com lesão de DNA. Dessa forma, a exposição ao chumbo parece atuar diretamente no testículo e no núcleo do espermatozoide, corroborando com o fato constatado por Apostoli et al. (1998) e Wadi & Ahmad (1999) que descreveram que o acetato de chumbo ao entrar na circulação sanguínea atravessa a barreira hemato-testicular afetando diretamente e se acumulando no testículo.

4. CONCLUSÕES

A exposição crônica ao chumbo causa efeitos negativos na funcionalidade de mitocôndria, integridade de membrana e DNA das células espermáticas de *Chrysomus ruficapillus*, o que pode afetar o desempenho reprodutivo dessas aves.

5. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J.A. 2001. The use of oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. **Environ. Int.**, New York, 27:673-679
- APOSTOLI, P.; KISS, P., PORRU, S.; BONDE, JP.; VANHOORNE, M.; Male reproductive toxicity of lead in animals and humans. **ASCLEPIOS Study Group Occup Environ Med** 1998; 55:364-374.
- BELTRAME, M.A. 2006. Diversidade de aves e pequenos mamíferos na lavoura de arroz irrigado. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas), 2p.
- BURGER, J. & GOCHFELD, M. 2004. Bioindicators for assessing human and ecological health. *In: Wiersma GB, ed. Environmental monitoring*. Boca Raton, FL: CRC Press; 541–66p.
- CIRNE MP; LÓPEZ-IBORRA GM. Breeding biology of chestnut-capped blackbirds in rice paddies in southern Brazil. **J Field Ornithol** 2005; 76:411-416.
- CORY-SLECHTA, D.A; WEISS, B.; COX, C. 1983. Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. **Toxicol Appl Pharmacol**; 71:342–52.
- CORY-SLECHTA, D.A. 1990. Exposure duration modifies the effect of low level lead on fixed interval performance. **NeuroToxicology**; 11:427–42.
- HARRISON, R. A. P.; VICKERS, Sally E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, n. 1, p. 343-352, 1990.
- MCLEAN, DJ.; KORN, N.; PEREZ, BS.; THURSTON, RJ.; Isolation and characterization of mitochondria from turkey spermatozoa. **J Androl** 1993; 14:433-438.
- OCHOA, I. H.; GUTIÉRREZ, HEREDIA, S.; VEJA, B.Q. 2006. Spermatozoa nucleus takes up lead during the epididymal maturation altering chromatin condensation, **Reproductive Toxicology**, 21: 171-178.
- WADI AS.; AHMAD G.; Effects of lead on the male reproductive system in mice. **J Toxicol Environ Health** 1999; 56:513-521.