

## AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NO SANGUE DE PEIXES MOSQUITO DIANTE DA EXPOSIÇÃO A DIFERENTES TEMPERATURAS

LARISSA NEY BASSINI<sup>1</sup>; THAINÃ MORALES ACOSTA<sup>2</sup>; IZANI BONEL ACOSTA<sup>3</sup>; CARINE DAHL CORCINI<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [larissanbassini@gmail.com](mailto:larissanbassini@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas - [acostathaina22@gmail.com](mailto:acostathaina22@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas - [izanibonel@hotmail.com](mailto:izanibonel@hotmail.com)

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas - [corcinicd@gmail.com](mailto:corcinicd@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

O Peixe Mosquito (*Gambusia affinis*), foi introduzido mundialmente a partir do leste da América do Norte, sendo um dos peixes de água doce mais abundantes e difundidos no mundo, pois apresentam uma extrema tolerância a baixas e altas temperaturas e ao baixo oxigênio dissolvido das condições climáticas (PYKE, 2008). O nome, se dá pela espécie ser predadora natural de larvas e pupas de mosquitos, servindo como uma das alternativas ambientalmente corretas para o controle de mosquitos, sendo introduzida em todo o mundo, se espalhando com sucesso e com rapidez por mais de 40 países. (WELCOMME, 1988).

O sangue é constituído por plasma que é responsável por conduzir três células distintas quanto suas funções, originando-se principalmente no timo, no fígado, no baço e no intestino que é responsável por levar os tecidos os nutrientes que são importantes nas atividades metabólicas e hormonais, também são responsáveis por retirar dos tecidos o que não é útil (SATAKE et al., 2009).

Nos peixes, a temperatura apresenta um papel crucial na regulação de seu ciclo de vida, afetando uma série de processos reprodutivos, como: o desenvolvimento e maturação de gametas, a ovulação, a desova, a embriogênese, a eclosão, o desenvolvimento e a sobrevivência (PANKHURST et al., 2011). Os eritrócitos são células em maior quantidade na circulação sanguínea, são nucleados nos peixes e são responsáveis por transportar oxigênio e gás carbônico, já os leucócitos são células de defesa, podendo ser utilizados para avaliar o sistema imunológico. Chamados de panoramas hematológicos, são utilizados como uma forma de indicação ambiental e saúde confiável de organismos (SERANI et al., 2013)

Estudar a composição e a função das células sanguíneas dos peixes é de extrema importância, visto que a condição de estresse, pode promover distúrbios homeostáticos, seguido de resposta compensatória fisiológica chamada de resposta integrada ao estresse e também entender como os organismos respondem e podem se adaptar a mudanças climáticas atuais e futuras. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos em amostras de sangue do Peixe Mosquito, diante da variação de temperatura.

### 2. METODOLOGIA

Neste experimento, foram utilizados (n=10) exemplares de Peixe Mosquito (*Gambusia affinis*), sendo 5 mantidos em um tanque externo (Tratamento 1) e os outros 5 mantidos em aquário no laboratório de Ictiologia localizado na

Universidade Federal de Pelotas, com condições controladas e temperatura de 27°C (Tratamento 2) por um período de 30 dias.

Para a coleta das amostras sanguíneas, cada animal foi retirado do aquário/tanque e foram contidos e anestesiados na bancada. A coleta foi realizada através punção branquial utilizando uma seringa com agulha de 12,7x0,33mm a fim de retirar 2µl de sangue de cada animal. As amostras foram armazenadas em um eppendorf com soro fetal bovino (SFB), para não haver coagulação sanguínea.

A análise por citometria de fluxo foi realizada usando Attune® Acoustic Focusing Flow Cytometer (Applied Biosystems, EUA) equipado com laser violeta (UV 405 nm-450/40, VL-1) para avaliar efeitos no sangue da exposição crônica a diferentes temperaturas da espécie. Os eritrócitos foram analisados quanto à ruptura celular, peroxidação lipídica, espécies reativas de oxigênio, fluidez da membrana, fragmentação do DNA e necrose.

A Ruptura Celular foi avaliada usando uma combinação de duas sondas fluorescentes, conjugado Anexina V-FITC (AnV, Sigma A9210) e iodeto de propídio, sendo classificadas como rompidas quando o interior da célula for corado.

Peroxidação Lipídica eritrocitária (LPO) foi quantificada utilizando a sonda bodipy em 100 µL da amostra, que foi incubada por 1 hora em temperatura ambiente (20°C). A taxa de lipoperoxidação foi calculada como a intensidade média da fluorescência verde (não rompida) e vermelha média (rompida).

Na necrose, foram utilizadas as sondas iodeto de propídio (IP) e YoPro, os quais somente penetram nas células com membrana plasmática danificada e por possuírem afinidade ao DNA, ligam-se a este com emissão das fluorescência na cor vermelha (SILVA et al., 2009).

Para a avaliação das Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) produzidas pelas células do sangue, foram utilizadas as sondas 2',7'-diclorofluoresceína diacetato e 5 µM de iodeto de propídio (PI). As amostras foram analisadas após incubação de 1 hora em temperatura ambiente (20°C). Apenas células vivas (PI negativo) foram selecionadas e medidas para produção de ROS pela intensidade mediana da fluorescência verde emitida.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com os resultados obtidos pela citometria de fluxo, foram realizadas as análises estatísticas no software Statistix 10TM. Utilizando o Teste U de Mann-Whitney e as médias foram comparadas por meio de Análise de Variância, e Tukey, com intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 1. Comparação entre as variáveis em condições de temperatura diferentes**

Variáveis	Tratamento 1 (22°C)	Tratamento 2 (27°C)
DNA	0,443 ± 0,0274 <sup>A</sup>	0,4610 ± 0,016 <sup>A</sup>
Fluidez	90,008 ± 0,915 <sup>A</sup>	89,2890 ± 1,187 <sup>A</sup>
LPO	72,348 ± 0,143 <sup>A</sup>	72,4370 ± 0,433 <sup>A</sup>

<b>ROS</b>	6200 ± 407,530 <sup>B</sup>	112965 ± 3724 <sup>A</sup>
<b>Necrose</b>	67,300 ± 1,539 <sup>A</sup>	67,0320 ± 1,894 <sup>A</sup>

\* A letra que se difere na linha, significa que houve uma diferença significativa entre os dois tratamentos.

Em resposta às mudanças ambientais, os organismos podem mediar sua fisiologia e história de vida modulando as respostas hormonais (ROMERO, 2002). O estresse térmico causado pela conversão do uso da terra e pelas mudanças climáticas, podendo assim facilitar respostas fisiológicas adaptativas que alteram a reprodução, o comportamento e as habilidades cognitivas dos peixes (POLVERINO et al., 2018, JACQUIN et al., 2020, BURT et al., 2011).

A exposição a temperatura de 27°C demonstrou uma diferença significativa do tratamento 1 para o tratamento 2, apenas na avaliação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).

#### 4. CONCLUSÕES

Com isso, concluímos que a exposição a temperatura de 27°C por 30 dias, apresentou diferença significativa apenas na variável referente a Espécies Reativas de Oxigênio (ROS). Uma segunda análise deveria ser realizada, deixando expostos por menos tempo, por conta da capacidade de adaptação a condições climáticas adversas que essa espécie possui.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONGA, Sjoerd. The stress response in fish. **Physiological Reviews**. v 77, n. 3. Estados Unidos, 1997.

BURT, J; HINCH, S ; PATTERSON, D. The importance of parentage in assessing temperature effects on fish early life history: A review of the experimental literature. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.21, p. 377-406, 2011.

ERIANI,R.; MOREIRA, L. B.; ABESSA,D. M. S.; ABUJAMARA,L. D.; CARVALHO,N; MARANHO, L; KIRSCHBAUM, A; RANZANIPAIVA, M. Hematological analysis of *Micropogonias furnieri*, Desmarest, 1823, Scianidae, from two Estuaries of Baixada Santista, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 58(special issue IV SOB):p. 87-92, 2010.

JACQUIN, Lisa; et al. Effects of Pollution on Fish Behavior, Personality, and Cognition: Some Research Perspectives. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 8, 2020.

PANKHURST, N; MUNDAY, P. Effects of climate change on fish reproduction and early life history stages. **Marine and Freshwater Research**. v. 62 p. 1015-1026, 2011.

POLVERINO, Giovanni; et al. Ecological conditions drive pace-of-life syndromes by shaping relationships between life history, physiology and behaviour in two populations of Eastern mosquitofish. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

PYKE, Graham. Plague Minnow or Mosquito Fish? A Review of the Biology and Impacts of Introduced *Gambusia* Species. **Annual Reviews of Ecology, Evolution, and Systematics**. v. 39 , p. 171-191, 2008.

SATAKE, F.; PÁDUA, S. B.; ISHIKAWA, M. M. Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: EMBRAPA, 2009.

WEDEMEYER, Gary. Physiology of Intensive Culture Systems. **Chapman and Hall**, New York. p. 45-55, 1996.

WELCOMME, R. International introductions of inland aquatic species. **Food and Agriculture Organization of the United Nation**. p. 115-117, 1988.