



TRICAÍNA METANO SULFONATO (MS-222) EM PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE ZEBRAFISH, *Danio Rerio*.

ETIANE ZIMERMANN¹; MARINA ZANIN²; IZANI BONEL ACOSTA³; STELA MARI
MENEGHELLO GHELLER⁴; ANTONIO SERGIO VARELA JUNIOR⁵; CARINE
DAHL CORCINI⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas (UFPeL) – etiane.zimmermann@gmail.com

² Universidade Federal do Rio Grande (FURG) - mariinazanin@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas (UFPeL) - izanibonel@hotmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas (UFPeL) – stelagheller@hotmail.com

⁵ Universidade Federal do Rio Grande (FURG) - varelaejas@gmail.com

⁶ Universidade Federal de Pelotas (UFPeL) - corcincd@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Existe um forte dilema ético envolvendo questões sobre a experimentação animal no que diz respeito ao momento da morte do animal, ou seja, a Eutanásia. Logo, tem-se um conflito no debate bioético: a utilização de animais de laboratórios, devido a preocupação com bem estar desses animais (CÂMARA *et al.*, 2011). Dentre os animais aquáticos de maior interesse na pesquisa podemos citar o peixe *Danio rerio*, conhecido popularmente como zebrafish ou paulistinha. As características desse peixe o tornam um modelo interessante para estudos devido sua semelhança com a genética humana, alta prolificidade, rápido desenvolvimento, transparência de embriões e larvas, tamanho diminuto facilitando a manipulação. (SPENCE *et al.*, 2008).

Para que o manejo destes animais ocorra de maneira menos estressante e desconfortável é necessário anestesia-los para que então, os procedimentos científicos sejam realizados, evitando dor, sofrimento, além de facilitar o manejo durante os procedimentos, mantendo o bem estar animal (ROUBACH E GOMES, 2001).

O único anestésico aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration, EUA) para o uso em peixes destinados ao consumo humano é o MS-222 (tricaína metanosulfonato) (NOCHETTO *et al.*, 2009). Ainda não se sabe ao certo o efeito deste anestésico no sistema reprodutivo de peixes, sendo esta, uma questão importante, pois o uso de anestésicos pode influenciar na vida reprodutiva destes animais, na manutenção de suas proles e até mesmo o resultado de pesquisas que visem esse sistema. Em vista disto o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito agudo do anestésico Tricaína Metano Sulfonato, previamente ao procedimento de eutanásia, na cinética das células espermáticas de machos adultos de *Danio rerio*.

2. METODOLOGIA

O experimento foi realizado no laboratório do Núcleo de Pesquisa Ensino e Extensão em Reprodução Animal (ReproPel) da Universidade Federal de Pelotas – UFPeL. Os procedimentos foram realizados sob licença do Comitê de Ética da Universidade Federal de Pelotas (7836–2017). Os animais encontravam-se devidamente acondicionados em caixas plásticas contendo água potável desclorada, 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, alcalinidade, ph e salinidade foram medidos antes dos tratamentos e mantidos constantes.

O experimento foi realizado utilizando o anestésico Tricaína Metano Sulfonato (MS-222) nas concentrações 0 mg/L (grupo controle), 200 mg/L e 400 mg/L. Para esse experimento foram utilizados trinta (30) machos da espécie *Danio Rerio*, sendo dez (10) peixes para cada tratamento. O grupo controle foi submetido à eutanásia por método de secção medular cervical.

Os animais foram imersos aleatoriamente e individualmente em um litro de água adicionado das concentrações pré-estabelecidas do anestésico até que os animais atingissem nível III.2 da anestesia, identificado através da ausência de movimentos voluntários, perda de equilíbrio, movimentos operculares superficiais e a ausência de reflexos. O tempo necessário para atingir o estágio III.2 foi anotado para cada peixes, e então, eles foram sacrificados por meio da secção medular espinhal da região cervical. Após o procedimento de eutanásia, as gônadas foram retiradas por meio de incisão abdominal e dissecação.

Após coletar o conteúdo espermático do interior das gônadas, o material espermático foi macerado em tubo eppendorf contendo 1,5 ml de de solução de descongelamento Beltsville, BTS, e colocado entre lâmina e lamínula para análises espermáticas utilizando o sistema computadorizado AndroVision® Software CASA (Minitube Br). A mensuração da cinética espermática foi feita através da avaliação de diversos parâmetros, sendo abordado no presente trabalho a Frequência do Batimento Flagelar (BCF).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por ser o único anestésico permitido na produção de peixes para consumo humano, o MS-222 (tricaína metanosulfonato) tornou-se bastante presente na aquicultura e passou a ser intensamente utilizado nos laboratórios de experimentação científica (NOCHETTO *et al.*, 2009).

Para assegurar o bem-estar dos peixes que são submetidos aos mais variados procedimentos, faz-se necessário o uso de anestésicos com a intenção de diminuir o estresse, dor e sofrimento. Porém, poucas informações estão disponíveis para ajudar na escolha do melhor anestésico a ser utilizado, apesar do grande número de peixes utilizados em laboratórios em todo o mundo atualmente (READMAN *et al.*, 2017).

Um dos parâmetros avaliados nesse estudo foi a Frequência do Batimento Flagelar (BCF), que é a frequência com que a cabeça do espermatozoide se move para trás e para frente durante um trajeto percorrido. A integridade das estruturas flagelares é imprescindível para a motilidade espermática, que ocorre por batimento flagelar. A mensuração objetiva desse processo fisiológico pode ser usada como biomarcador não apenas na predição da fertilidade, mas também na avaliação de agentes farmacológicos administrados para tratar infertilidade (CELEGHINI *et al.* 2007).

Tratamento	Frequência do Batimento Flagelar (BCF)
0 mg/L (Controle)	31,17 ± 0,4 ^A
200 mg/L Tricaína	31,63 ± 0,3 ^A
400 mg/L Tricaína	31,92 ± 0,3 ^A



Na peça intermediária, o axonema é circundado por um arranjo helicoidal de mitocôndrias, as quais disponibilizam energia para o batimento flagelar através da produção de ATP. Todas as alterações da peça intermediária interferem na produção de energia, ou seja, na produção de ATP, necessário para que ocorra o batimento flagelar estando diretamente relacionada com a motilidade espermática.

Os resultados demonstraram que o MS-222 (tricaína metanosulfonato) não alterou a frequência de batimento flagelar, sugerindo que sua utilização pode ser benéfica em procedimentos anestésicos em peixes da espécie *Danio rerio* com experimentos que visem o estudo desse parâmetro, e na manutenção da qualidade da amostra seminal.

4. CONCLUSÕES

O estudo demonstrou que o MS-222 (tricaína metanosulfonato) não influenciou na frequência do batimento flagelar (BCF), não havendo diferenças estatísticas entre os tratamentos. Apesar da integridade das estruturas flagelares ser indispensável para a motilidade espermática, outros parâmetros são importantes para analisar a qualidade espermática e fertilidade como um todo, necessitando assim de mais estudos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

READMAN, G. D., OWEN, S. F., KNOWLES, T. G., MURRELL, J. C. Species specific anaesthetics for fish anaesthesia and euthanasia. **Scientific reports**, 7(1), 7102, 2017. doi:10.1038/s41598-017-06917-2.

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.

NOCHETTO, C.B. et al. Determination of tricaine residues in fish by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 92, p. 1241-1248. 2009.

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