

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITOS DO ANESTÉSICO TRICAÍNA METANOSULFONATO SOBRE O ESTRESSE
E ASPECTOS REPRODUTIVOS EM MACHOS DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)**

NATHALIA DOS SANTOS TEIXEIRA

PORTO ALEGRE
junho/2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**EFEITOS DO ANESTÉSICO TRICAÍNA METANOSULFONATO SOBRE O ESTRESSE
E ASPECTOS REPRODUTIVOS EM MACHOS DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)**

Autor: Nathalia dos Santos Teixeira

**Trabalho apresentado à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para
a obtenção da graduação em Medicina
Veterinária**

Orientador: Danilo P. Streit Jr.

PORTO ALEGRE
2018/1

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha família. Meu pai, João Batista e minha mãe. Claudia, por terem acreditado no poder de uma boa educação e formação profissional. As pessoas que me ensinaram que a educação (não a que se aprende na escola) é a base de tudo, que amar vai muito além de demonstrar, que respeitar as diferenças é o mínimo que devemos fazer, que ser humilde é necessário para uma vida feliz. Obrigada pelo exemplo, carinho e apoio essenciais para a formação do meu caráter. Vocês são meu orgulho.

À minha irmã Gabrielli, agradeço imensamente pela sua existência. Obrigada por ser minha parceira. Não haveria graça se não pudesse dividir tudo com você.

Agradeço a minha avó Célia, que sempre acreditou em mim, ajudando e estando presente em todos os momentos da minha vida. Esta senhorinha teimosa, que sempre me viu melhor do que sou. Minha segunda mãe. Obrigada de todo coração vó, sem você eu não teria chegado onde cheguei. Agradeço ao meu avô, Renato, por estar sempre por perto e me apoiar em todos os momentos. Amo vocês!

Agradeço às melhores amigas que eu poderia ter na faculdade, as quais sempre estiveram ao meu lado onde quer que eu estivesse. Obrigada pela parceria, seja na hora das brincadeiras ou nos momentos de falar sério. Se bem que, não conseguimos levar muita coisa na seriedade. Sei que posso contar sempre com vocês.

Ao professor Danilo Pedro Streit Jr., obrigada pela orientação, incentivo, ensinamentos e por me acolher no grupo, dando oportunidade para o meu desenvolvimento acadêmico.

À Lis Marques, que foi uma verdadeira professora, que me inspirou e me ensinou muito sobre o mundo da pesquisa. Obrigada pelo incentivo e por apostar em mim. Além de tudo, obrigada pela paciência e por toda ajuda em todas as etapas do projeto. Você é demais!

Aos colegas do Grupo de Pesquisas AQUAM, especialmente aos pós-graduandos, Rômulo e Ana Amélia pelo auxílio. Agradeço também aos estagiários, Thales e Gabriela, que se dispuseram a ajudar no experimento.

Agradeço a todos os locais em que estagiei e pessoas que conheci durante minha graduação. A todos que de alguma forma participaram da minha caminhada acadêmica e formação pessoal.

RESUMO

A anestesia é uma prática comum em peixes utilizados para fins de pesquisa e piscicultura. Para ambas as aplicações, é importante entender os efeitos do anestésico no animal e nos tecidos de interesse, para garantir a validade dos dados e melhorar o bem-estar animal. O anestésico sintético tricaina metanosulfonato (MS-222) é o anestésico para peixe mais difundido em todo mundo. Além disso, é um dos únicos anestésicos liberados para o uso em peixes destinados ao consumo humano nos Estados Unidos pelo FDA (*Food and Drug Administration*). A produção de peixes em cativeiro somente é possível com reprodução artificial, e sabe-se que a manipulação em peixes é um estímulo estressor. O método mais comum de determinar a resposta ao estresse em peixes é medir mudanças no nível circulante de cortisol. Assim, o estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes concentrações (0, 100, 200 e 300 mg/L) do anestésico MS-222 sobre os níveis de cortisol e sua influência sobre a manutenção da qualidade espermática de machos de jundiá (*Rhamdia quelen*). Após indução hormonal, 29 machos sexualmente maduros, com peso médio de 363,00 ± 71,24g, foram distribuídos aleatoriamente entre os tratamentos, e em seguida foram realizadas as coletas de sêmen e sangue. Os seguintes parâmetros foram avaliados: tempo de indução à anestesia, taxa de motilidade, concentração espermática, morfologia espermática, concentração de cortisol plasmático, concentração plasmática de hormônios reprodutivos (testosterona, 17 α Hidroxiprogesterona e estradiol). Os dados foram analisados por meio de ANOVA seguido de teste Tukey ($P < 0,05$) para os dados paramétricos, e por Kruskal-Wallis, seguido de Dunn ($P < 0,05$) para os dados não paramétricos. Não houve diferença estatística nos níveis de testosterona e 17 α Hidroxiprogesterona, bem como na morfologia espermática. No tempo de indução a anestesia, o tratamento com 100 mg/L de MS-222 apresentou maior tempo de indução (440,14 ± 51,32s, $P = 0,0145$) comparado aos tratamentos de 200 mg/L (283,43 ± 46,35s) e 300 mg/L (243,38 ± 29,54s). A taxa de motilidade espermática foi significativamente maior no grupo controle (90,00 ± 4,47%), quando comparada ao tratamento de 300 mg/L (66,25 ± 5,65%), porém não diferiu dos tratamentos 100 e 200 mg/L. O nível de estradiol foi significativamente menor nos peixes anestesiados com 200 mg/L (574,10 ± 75,49 pg/mL) em relação ao controle (1189,00 ± 212,20 pg/mL). Nos níveis de cortisol plasmático, não houve diferença entre o controle (96,86 ± 7,08 ng/mL) e os tratamentos 100 (143,43 ± 24,97 ng/mL), 200 (138,29 ± 23,20 ng/mL) e 300 mg/L (182,50 ± 42,03 ng/mL). O MS-222 anestesia o peixe por meio do bloqueio dos canais de sódio impedindo o desenvolvimento de potenciais de ação nervosa. No entanto, no presente estudo o MS-222 não inibiu a secreção de cortisol. Sabe-se que em peixes anestesiados com MS-222, os níveis de cortisol plasmático aumentam ao longo do tempo. Além disso, a indução lenta da anestesia até estágio I durante a exposição ao MS-222 pode proporcionar tempo para os peixes detectarem as propriedades químicas do fármaco. Apesar ter ocorrido redução da concentração de estradiol (200 mg/L) e da motilidade espermática em todos tratamentos, outros parâmetros reprodutivos, como a taxa de fecundação, devem ser avaliados para uma melhor compreensão de como o MS-222 influencia a reprodução de peixes.

Palavras chave: anestésico, cortisol, estresse, reprodução, sêmen

ABSTRACT

*Anesthesia is a common practice in fish used for research and pisciculture purposes. For both applications, it is important to understand the effects of the anesthetic on the animal and the tissues of interest, to ensure the validity of the data and to improve animal welfare. The synthetic anesthetic tricain methanosufonate (MS-222) is the most widespread anesthetic for fish worldwide. Besides that, it is one of the only anesthetics released for use in fish intended for human consumption in the United States by the FDA (Food and Drug Administration). The production of captive fish is only possible with artificial reproduction, and it is known that manipulation in fish is a stressor stimulus. The most common method of determining the stress response in fish is to measure changes in the circulating level of cortisol. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the effects of different concentrations (100, 200 and 300 mg / L) of the anesthetic MS-222 on cortisol levels and their influence on the maintenance of sperm quality in males of jundia (*Rhamdia quelen*). After hormonal induction, 29 sexually mature males, with an average weight of 363.00 ± 71.24 g, were randomly distributed among the treatments, and their semen and blood samples were collected. The following parameters were evaluated: anesthesia induction time, motility rate, sperm concentration, sperm morphology, plasma cortisol concentration, plasma concentration of reproductive hormones (testosterone, 17α -hydroxyprogesterone and estradiol). Data were analyzed using ANOVA followed by Tukey test ($P < 0.05$) for the parametric data, and by Kruskal-Wallis, followed by Dunn ($P < 0.05$) for non-parametric data. There was no statistical difference in the levels of testosterone and 17α -hydroxyprogesterone, as well as sperm morphology. At the time of induction of anesthesia, the treatment with tricaine 100 mg / L presented a longer induction time (440.14 ± 51.32 s, $P = 0.0145$) compared to treatments of 200 mg / L (283.43 ± 46 , 35s) and 300 mg / L (243.38 ± 29.54 s). The sperm motility rate was significantly higher in the control group ($90.00 \pm 4.47\%$) when compared to the 300 mg / L treatment ($66.25 \pm 5.65\%$), but did not differ from treatments 100 and 200 mg / L. The level of estradiol was significantly lower in fish anesthetized with 200 mg / L (574.10 ± 75.49 pg / mL) than the control (1189.00 ± 212.20 pg / mL). In the plasma cortisol levels, there was no difference between the control (96.86 ± 7.08 ng / mL) and the treatments 100 (143.43 ± 24.97 ng / mL), 200 (138.29 ± 23.20 ng / mL) and 300 mg / L (182.50 ± 42.03 ng / mL). The MS-222 anesthetizes the fish by blocking the sodium channels, preventing the development of nerve action potentials. However, in the present study MS-222 did not inhibit cortisol secretion. It is known that in fish anesthetized with MS-222, plasma cortisol levels increase over time. In addition, slow induction of anesthesia to stage I during exposure to MS-222 may provide time for fish to detect the chemical properties of the drug. Although a reduction in the concentration of estradiol (200 mg / L) and sperm motility in all treatments has occurred, other reproductive parameters, such as fertilization rate, should be evaluated for a better understanding of how MS-222 influences fish reproduction.*

Key words: anesthetic, cortisol, stress, reproduction, semen

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	REVISÃO TEÓRICA	8
2.1	Estresse em peixes.....	8
2.2	Anestesia em peixes.....	11
2.3	Tricaína Metanosulfonato.....	12
2.4	Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>)	14
3	OBJETIVOS	15
3.1	Objetivo Principal.....	15
3.2	Objetivos Específicos.....	15
4	MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1	Delineamento experimental.....	16
4.2	Indução hormonal.....	16
4.3	Banhos anestésicos.....	17
4.4	Coleta de sêmen.....	18
4.5	Coleta de sangue.....	18
4.6	Contagem diferencial de leucócitos.....	18
4.7	Análise de motilidade e integridade de membrana.....	18
4.8	Análise estatística.....	19
5	RESULTADOS	19
6	DISCUSSÃO	24
7	CONCLUSÃO	28
	REFERÊNCIAS	29

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a aquicultura vem se destacando como uma atividade mundialmente competitiva e sustentável na produção de alimentos saudáveis (FAO, 2016), apresentando contribuição relevante para geração de emprego e renda. No Brasil, a piscicultura é uma atividade com grande potencial de crescimento, com uma produção de 507,12 mil toneladas de peixes em 2016, dados publicados pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), representando um aumento de 4,4% em relação ao ano anterior.

Nos sistemas intensivos de piscicultura, os animais passam por uma série de manejos estressantes (VIDAL et al., 2008). Dentre os vários procedimentos realizados, a reprodução induzida destaca-se por envolver intensa manipulação dos reprodutores. Como consequência, pode ocorrer perda de apetite e peso, redução no crescimento, aparecimento de doenças e até mesmo a morte dos animais (BARCELLOS et al., 2000). Além das injúrias causadas nos animais, o estresse pode resultar em movimentos bruscos dos peixes em um procedimento de manejo, o que também coloca a segurança dos trabalhadores em risco (BARBOSA et al., 2007).

Os fatores estressantes relacionados ao sistema produtivo desencadeiam uma cascata de alterações endócrinas responsáveis pela resposta ao estresse que se caracteriza em três fases: primária, secundária e terciária. A resposta primária está relacionada a alterações na atividade de neurotransmissores que levam ao aumento dos níveis circulantes de catecolaminas e corticosteroides, principalmente cortisol (BARTON, 2002). Como resultado da elevação desses hormônios no sistema circulatório, uma ampla gama de ações e efeitos subsequentes pode ser observada a níveis sanguíneo e tecidual, configurando a resposta secundária. Essas alterações incluem aumento nos níveis de glicose e lactato circulantes, desenvolvimento de distúrbios osmorregulatórios e alterações hematológicas e imunológicas (BARTON, 2002; MARICCHIOLO e GENOVESE, 2011). Além disso, pode causar alterações nas características de carne e longevidade do produto (MENDES et al., 2015). A persistência destes estressores, caracterizando a resposta terciária pode induzir redução significativa do bem-estar influenciando negativamente a reprodução (MARICCHIOLO e GENOVESE, 2011).

A reprodução animal é regulada por uma interação complexa de vários hormônios que podem ser, individual ou coletivamente, modulados por fatores ambientais e de manejo (SOSO et al., 2008). Dessa forma, o estresse pode afetar a reprodução de várias maneiras, dependendo do momento do ciclo da vida e da gravidade e duração do estressor (SCHRECK,

2010). As consequências biológicas do estresse na reprodução podem se expressar por alterações tanto no comportamento reprodutivo quanto na quantidade e qualidade dos gametas (BARCELLOS et al., 2000), visto que dependem de um ambiente hormonal adequado durante o seu desenvolvimento (RURANGWA et al., 2004). Campbell et al. (1994) identificaram redução no peso e no volume dos oocitos, além da diminuição na sobrevivência da progênie de trutas marrons (*S. trutta*) e trutas arco-íris (*O. mykiss*) machos e fêmeas submetidas a estresse de confinamento nos meses imediatamente anteriores à ovulação. Dessa forma, nota-se a importância do cuidado no manejo dos animais em pisciculturas, devendo este ser realizado com base em princípios relevantes para a manutenção da saúde animal, a sustentabilidade ambiental dos sistemas aquícolas e a rentabilidade da atividade, pois, o cuidado com os peixes reprodutores é crucial para determinar, em um sistema de produção, o sucesso de sobrevivência da prole.

De acordo com Schreck, et al (2001), a compreensão dos efeitos dos eventos estressantes a nível populacional e individual é indispensável para a biologia da conservação, manejo de populações selvagens e de aquicultura. Assim, uma forma de aperfeiçoar o manejo dos peixes é minimizar o estresse, preservando o bem-estar, e para alcançar este objetivo, o uso de anestésicos e/ou sedativos vem sendo sugeridos nas pisciculturas (PEREIRA-DA-SILVA, 2009). Neste sentido, faz-se necessário o conhecimento amplo da técnica e de suas variáveis, das particularidades dos fármacos e da espécie a ser anestesiada, com a finalidade de se evitar resultados indesejáveis.

2. REVISÃO TEÓRICA

2.1. Estresse em peixes

Na natureza, o mais comum é a ocorrência de estressores agudos derivados de situações de desafio (predação, luta) normalmente a curto prazo e com alta intensidade. Já situações crônicas em que a intensidade do estressor é baixa, mas persistente, normalmente são encontradas em peixes sujeitos a atividades antropogênicas, como a poluição e aquicultura (TORT, 2011). Fatores estressantes, como os relacionados ao sistema produtivo de peixes, desencadeiam a resposta ao estresse, compreendendo uma série de alterações fisiológicas controladas pelo sistema neuroendócrino (MARICCHIOLO e GENOVESE, 2011). Os efeitos desta resposta são divididos em primário, secundário e terciário.

Os efeitos primários compreendem os aumentos dos níveis sanguíneos de catecolaminas (principalmente adrenalina) e corticosteroides (principalmente cortisol) decorrentes da estimulação das células e interrenais, respectivamente (BARTON, 2002). A liberação de adrenalina ocorre através inervação ganglionar simpática sobre as células cromafínicas localizadas na porção anterior do rim que é ativada quando o sistema nervoso central (SNC) identifica uma ameaça ao organismo (BARCELLOS et al., 2000). A liberação do cortisol ocorre como resultado da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI) devido à presença do agente estressor que induz a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo, este, por sua vez, atua na hipófise estimulando o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que age sobre a glândula interrenal, liberando cortisol (WENDELAAR BONGA, 1997). O nível circulante de cortisol é o indicador mais amplamente acessado a fim de mensurar resposta primária ao estresse decorrente da anestesia em peixes (BARTON, 2002).

Estudos de Maricchiolo e Genovese (2011) conduzidos com duas espécies de peixes, *Pagellus bogaraveo* e *Seriola dumerilii*, com diferentes anestésicos (MS-222 e eugenol) apontaram elevação de cortisol após exposição à anestesia. Isto poderia ocorrer indiretamente, devido à baixa disponibilidade de oxigênio durante o procedimento anestésico pela ventilação branquial insuficiente, ou via estimulação direta do eixo HHI (BOLASINA, 2006). No entanto, Iversen et al. (2003) mostraram não haver alteração neste parâmetro depois de aplicada a anestesia (metomidato, imidazol, eugenol, iso-eugenol e benzocaina) em *Salmo salar*, demonstrando que o fármaco seria capaz de prevenir a liberação de cortisol.

A resposta secundária compreende uma série de alterações resultantes do aumento dos níveis dos hormônios do estresse no plasma. Esta resulta em alterações metabólicas hematológicas, hidrominerais, entre outras (WENDELAAR BONGA, 1997). A elevação do cortisol plasmático está comprovadamente relacionada à diminuição no número de linfócitos circulantes, influenciando negativamente a imunocompetência do animal no futuro (BARCELLOS et al., 2000). As catecolaminas atuam na osmorregulação, pois possuem uma ação estimulatória na perfusão branquial, aumentando a área de contato das lamelas branquiais com a água o que resulta em um aumento das trocas iônicas através das brânquias (WENDELAAR BONGA, 1997). Uma das principais características da segunda fase da resposta é a ocorrência de hiperglicemia que ocorre devido a ação de catecolaminas e cortisol que

estimulam a gliconeogênese. Essa glicose serviria para suprir a demanda energética aumentada, depositando-se no fígado como glicogênio (BARCELLOS et al., 2000). Além disso, o aumento dos níveis circulantes de glicose e lactato antecipa a entrada do peixe em rigor mortis, diminuindo a qualidade e tempo de vida útil de sua carne (MENDES et al., 2015).

A resposta terciária este relacionada à manutenção de altas concentrações plasmáticas de cortisol no plasma, o que pode ocasionar o aparecimento de uma série de efeitos indesejáveis no metabolismo, crescimento, comportamento, reprodução e na atividade imune (WENDELAAR BONGA, 1997). O estresse pode afetar a reprodução de várias maneiras, dependendo de quando o ciclo de vida é vivido e da gravidade e duração do estressor. Pode acelerar a ovulação ou inibir a reprodução (SCHERECK, 2010). As consequências biológicas do estresse na reprodução podem expressar alterações tanto no comportamento reprodutivo quanto na quantidade e qualidade de gametas já que a elevação do cortisol circulante pode agir diretamente ou indiretamente na supressão da secreção de hormônios reprodutivos (BARCELLOS et al., 2000). Por outro lado, a elevação do cortisol plasmático em peixes em resposta ao estresse e a subsequente supressão da função reprodutiva por esse hormônio parece contraditória com o aumento natural nos títulos de cortisol observados durante a maturação final. Muitos estudos documentaram a elevação dos corticosteróides durante a maturação sexual final dos peixes, notadamente salmonídeos, e sugeriram que os aumentos ou surtos de corticosteroides são efetivos e até mesmo podem ser necessários para estimular a ovulação (BARTON e IWAMA, 1991). Ainda, uma pequena quantidade de estresse tem um efeito positivo e estressores mais severos têm um efeito negativo na capacidade reprodutiva (SCHRECK et al., 2010).

A imunodeficiência, por outro lado, é umas das mais importantes respostas ao estresse. O agente estressor causa um rápido aumento nos níveis de neutrófilos circulantes e redução no número de linfócitos, visto que os linfócitos B e T têm suas funções afetadas, o que pode estar associado à diminuição da resistência à patógenos oportunistas (WENDELAAR BONGA, 1997). Nardocci, et al. (2014) sugerem que quando o estressor é agudo e uma resposta de curto prazo é estimulada, a resposta imune do peixe é aumentar a função inata. Logo, o estresse agudo resulta em um aumento no número de leucócitos circulantes. Ainda, de acordo com estes autores, esse fenômeno está relacionado à ativação do sistema nervoso simpático e à liberação de catecolaminas, que mobilizam tanto os eritrócitos quanto os leucócitos. Se o estressor é crônico, a resposta imune é suprimida, e isso aumenta a possibilidade de infecção.

Pois, como as situações de estresse são energeticamente exigentes, espera-se que outros hormônios envolvidos no suporte metabólico tenham uma influência sobre a função imune. Como resultado, o GH (hormônio do crescimento), os opióides e os hormônios da tireoide também afetam as respostas imunes. Esses autores enfatizam que, ao contrário dos mamíferos, os peixes usam um único órgão chamado cabeça do rim como o principal local de produção de cortisol (células interrenais) e catecolaminas (células cromafínicas), além da hematopoiese e produção de anticorpos. Assim, as interações parácrinas diretas entre os sistemas imunológico e neuroendócrino neste órgão são críticas.

Além disso, podem ocorrer quedas na produção e na lucratividade da atividade, uma vez que os peixes não atingem o tamanho e o peso desejados para comercialização pois o aporte energético da alimentação e as reservas corporais estariam sendo mobilizados pelas alterações fisiológicas, provocadas pela resposta ao estresse, e pela manutenção da homeostase (BARCELLOS et al., 2000).

2.2. Anestesia em peixes

A anestesia é, por definição, um estado reversível biológico induzido por um agente externo, que resulta na perda da sensibilidade de forma parcial ou completa ou perda do controle neuromotor voluntário, alcançado através do uso de meios químicos ou não químicos (MARICCHIOLO, GENOVESE, 2011). As drogas anestésicas e analgésicas são usadas em animais aquáticos, especialmente peixes, tanto na pesquisa quanto em práticas rotineiras no campo visando reduzir o estresse e prevenir a mortalidade durante o transporte, despesca, inseminação artificial, extrusão de gametas, exame, biópsia, manipulação, procedimentos cirúrgicos, classificação e chipagem (ADEL et al, 2016).

Em peixes, a anestesia é mais comumente realizada por meio de banhos de imersão, sendo o fármaco dissolvido na água e absorvido principalmente pelas brânquias e em menor quantidade através da pele (SNEDDON, 2012; COYLE et al., 2004). O anestésico a ser usado nos animais deve apresentar rápida ação depressora sobre o SNC, sem causar efeitos deletérios posteriores para o peixe (PARK et al., 2008).

Na avaliação da anestesia, são categorizados seis estágios de indução à anestesia: (1) sedação leve, caracterizado por perda de reação aos estímulos visuais e ao toque; (2) anestesia leve, em que ocorre perda parcial do equilíbrio; (3) anestesia profunda, caracterizada pela perda

total do equilíbrio; (4) anestesia cirúrgica I, em que ocorre a diminuição dos movimentos operculares; (5) anestesia cirúrgica II, com mínimo movimento opercular, e o peixe fica estático e (6) colapso medular, caracterizado por overdose ou tempo excessivo de anestesia. Desse modo, o estágio normalmente utilizado para biometria, manuseio de peixes reprodutores é o de anestesia profunda, que deve ser atingido entre um e três minutos (VIDAL et al., 2007). Para avaliações de sanidade e intervenções cirúrgicas o estágio buscado é o de anestesia cirúrgica e este deve ser alcançado entre três e cinco minutos (ROUBACH e GOMES, 2001). Para a recuperação, os animais são transferidos para recipientes com água livre de anestésico possibilitando o reestabelecimento de sua atividade normal (NEIFFER e STAMPER, 2009).

Para procedimentos invasivos, como intervenções cirúrgicas, níveis profundos de depressão no SNC são necessários a fim de preservar o bem-estar do animal e facilitar o manuseio (SNEDDON, 2012). Porém, deve-se estabelecer o protocolo ideal delimitando tempo de exposição à determinada concentração para evitar o aprofundamento irreversível da anestesia. Além do fármaco e do tempo de exposição, a eficácia e a segurança da anestesia em peixes também dependem de variáveis biológicas e ambientais (COYLE et al., 2004). Espécie, idade, estágio de desenvolvimento, tamanho, razão entre área branquial e peso, condição corporal, sexo e maturidade sexual são algumas das variáveis relativas ao animal que devem ser consideradas. Além destes fatores, as condições ambientais como temperatura e concentração de oxigênio devem ser analisadas antes do procedimento anestésico (GOMES et al., 2011). Temperaturas altas podem acelerar a indução e a recuperação, enquanto situações de hipóxia podem retardar ou até mesmo impedir a recuperação da anestesia. Além disso, oscilações bruscas nos parâmetros de qualidade da água podem estressar os peixes, o que influencia na difusão do anestésico devido a alterações na taxa ventilatória (SNEDDON, 2012).

2.3. Tricaína metanosulfonato

A tricaína metanosulfonato (metanosulfonato do 3-amino benzoato de etila), ou MS-222, é atualmente o fármaco mais utilizado na anestesia de peixes em banho de imersão. É comercializado no formato de pó e este é adicionado diretamente à água, embora uma solução estoque possa ser feita. Uma grande vantagem sobre outros agentes anestésicos é o fato de ser muito solúvel em água. No entanto, em águas ácidas moles, pode reduzir o pH, mas isso pode ser facilmente remediado com pequenas quantidades de bicarbonato de sódio para elevar o pH a

níveis normais. Além disso, para manter uma boa atividade, o pó deve ser protegido da luz (BROWN, 2011).

É o único fármaco aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso com peixes para consumo nos EUA, embora seja obrigatório esperar no mínimo 21 dias para o consumo humano (MARICCHIOLO e GENOVESE, 2011). Além disso, a resolução N° 1000 (2012) do Conselho Federal de Medicina Veterinária e o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2018) recomendam o uso do MS-222 para eutanásia de peixes em banho de imersão ou aspersão branquial. Desde seu reconhecimento como anestésico, é recomendado para uso em diferentes tipos de espécies animais tais como peixes, répteis e anfíbios (CHO e HEATH, 2000; CONROY et al., 2009; WEBB et al., 2005).

O MS-222 age sistemicamente em peixes, mas é considerado um agente anestésico local em outros animais. Fornece anestesia geral, bloqueando os canais de sódio voltagem-dependentes e, portanto, inibindo a transmissão neural dentro dos sistemas nervoso central e periférico (ATTILI e HUGHES, 2014), possuindo um efeito rápido sobre a atividade muscular, com consequente recuperação rápida pelo animal. Assim que o fármaco é absorvido pelas brânquias, entra na corrente sanguínea e se distribui por todo o corpo. Uma vez dentro do corpo, as concentrações de MS-222 são metabolizadas rapidamente por reações de acetilação e excretadas. A principal via de excreção para os metabólitos ocorre através das brânquias. A parte que não foi metabolizada e alguns metabólitos são excretados pelos rins. A meia-vida plasmática estimada do MS-222 é de 1,5 a 4 horas. Após 8 e 24 h, torna-se indetectável no sangue total e na urina, respectivamente (CARTER et al., 2010). Este anestésico possui em ampla margem de segurança em várias espécies, no entanto, peixes grandes adultos podem reter o anestésico por um longo período após a recuperação (BROWN, 2011).

A eficácia do MS-222 depende de diversos fatores ambientais, como temperatura, concentração de oxigênio, pH, dureza e salinidade da água e de fatores biológicos como idade, sexo, tamanho, peso, percentagem de gordura, maturidade, espécies de peixes e densidade de biomassa. Variações destes fatores devem ser consideradas ao determinar a dosagem do anestésico a ser utilizado (POPOVIC et al., 2012). Para sedação da espécie *Ictalurus punctatus* (Channel catfish) a dose indicada é de 90 mg/L (WELKER et al., 2007). Segundo Saint-Erne (2014), são indicadas as doses de 10 a 40 mg/L para sedação, 50 a 400 mg/ para indução anestésica e 50 a 10 mg/L para manutenção da anestesia em peixes. De acordo com Brown

(2011), as taxas gerais de dose variam de 20 a 150 mg / l, dependendo da espécie de peixe. No trabalho de Gressler et al. (2012) os tempos de indução e recuperação registrados para o jundiá *Rhamdia quelen* (155.74 ± 2.45 g) quando anestesiados com MS-222 a 300 mg/ L foram bastante satisfatórios. A recuperação é geralmente rápida e espera-se que o equilíbrio retorne após apenas alguns minutos. Um tempo de recuperação superior a 10 minutos sugere que está sendo usado muito anestésico ou que o tempo de exposição é muito longo.

2.4. Jundiá (*Rhamdia quelen*)

O jundiá, *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, PIMELODIDAE), é um peixe de distribuição neotropical encontrado desde o centro da Argentina até o sul do México. É uma espécie de peixe nativa bastante produzida na região Sul do Brasil, pois apresenta além das características de adaptabilidade aos sistemas de cultivo, grande resistência aos períodos de frio, rápido crescimento, rusticidade ao manejo e fácil adaptação à alimentação artificial (FEIDEN et al., 2010). Além disso, possui uma carne saborosa com baixo teor de gordura e com poucas espinhas (CARNEIRO et al., 2004).

É um peixe de couro e sua coloração varia de marrom avermelhado claro a cinza ardósia. Vive em lagos e poços fundos dos rios, preferindo ambientes de águas mais calmas junto às margens e vegetação escondendo-se entre pedras e troncos e, devido ao seu hábito noturno, sai à noite à procura de alimento. Os adultos são onívoros com clara preferência por peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos. A maturidade sexual é atingida por volta de um ano de idade nos dois sexos.

Os machos iniciam o processo de maturação gonadal com 13,4 cm e as fêmeas com 16,5 cm (GOMES et al., 2000). Segundo Carneiro et al. (2004), os machos desta espécie apresentam rápida maturação sexual, produzindo sêmen antes dos seis meses de idade e com menos de 100 g de peso vivo. O período reprodutivo do jundiá ocorre nos meses mais quentes do ano, havendo relativa variação no desenvolvimento gonadal ao longo do ano devido a fatores como temperatura, densidade de estocagem, manejo e tipo de dieta (GHIRALDELLI et al., 2007). Essa espécie é ovulípara no habitat natural e, quando prontos para desova, grandes cardumes procuram lugares de água rasa, limpa, pouco corrente e com fundo pedregoso. Os ovos são demersais e não aderentes. A desova dessa espécie é assincrônica, uma vez que os ovos são recrutados de populações heterogêneas de oócitos em desenvolvimento e são liberados em várias

ocasiões do período reprodutivo (GOMES et al., 2000). Esta espécie apresenta reduzida capacidade de fertilização, pois o número de espermatozóide necessário para fertilizar um único ovócito é relativamente alto (BOMBARDELLI et al., 2006).

A taxa de crescimento dos machos é maior do que a das fêmeas até o terceiro ou quarto ano de vida, quando a situação se inverte, pois, estas passam a crescer mais rapidamente. Consequentemente, as fêmeas apresentam maior comprimento que os machos a partir do terceiro ano de vida, sendo que o tempo de vida das fêmeas é de 21 anos e dos machos 11 anos (GOMES et al., 2000).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Principal

Verificar o efeito de diferentes concentrações de MS-222 (100, 200, 300 mg/L) sobre o estresse e aspectos reprodutivos em reprodutores machos de jundiá (*Rhamdia quelen*).

3.2. Objetivos específicos

1) avaliar a influência dos diferentes tipos e concentrações de anestésicos sobre níveis dos seguintes hormônios:

- Cortisol
- Testosterona
- 17 α Hidroxiprogesterona
- Estradiol

2) determinar a influência do anestésico sobre os parâmetros espermáticos (motilidade, morfologia e integridade de membrana)

3) avaliar a resposta ao estresse através de contagem diferencial de leucócitos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. Os animais a serem utilizados foram adquiridos da Piscicultura Panamá Ltda., Est. Geral Bom Retiro, km 8, Paulo Lopes – SC, CEP 88490-000, CNPJ 01.392.974/0001-20. O transporte foi realizado em caixa de transporte de peixes vivos de

400 litros em fibra de vidro, marca Trevisan, mantendo os níveis de oxigênio dissolvido, temperatura, amônia e pH controlados. Foi adicionado sal a água de transporte (CARMICHAEL et al., 1984) e realizado jejum nas 24 horas anteriores (WEIRICH, 1997).

Os animais, 29 ao total, passaram por período de adaptação de duas semanas nos tanques, antes do início do experimento. Após a realização da coleta os animais foram mantidos no Laboratório de Aquacultura (AQUAM).

Os peixes foram acondicionados aleatoriamente em caixas d'água de 500 L cada, totalizando sete animais por caixa/tratamento (com exceção de uma caixa onde se acondicionou 8 animais). A temperatura da água do tanque foi mensurada diariamente às 8 h e às 16 h por meio de termômetro de mercúrio de precisão de $\pm 1,0^{\circ}\text{C}$. Semanalmente foram avaliados os parâmetros físico-químicos: temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH, oxigênio dissolvido (ppm), amônia total (ppm), nitrito (ppm), alcalinidade ($\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$). As análises serão aferidas através de Oxímetro digital Modelo 550A – YSI – Yellow Springs, EUA, pHmetro digital Servylabm PA/210e um kit colorimétrico Labcon Test®. A alimentação foi realizada duas vezes ao dia, às 08 e às 16 horas, até a saciedade aparente. Os machos foram pesados, medidos e identificados com chips subcutâneos.

4.1. Delineamento experimental

O delineamento utilizado inteiramente ao acaso.

Para a obtenção de uma anestesia e recuperação bastante satisfatórias em juvenis de *Rhamdia quelen*, a dose de MS-222 indicada por Gressler et al. (2012) é a de 300 mg/L. Já Sneddon (2012) indica a dose de 40 a 400 mg/L e Saint-Erne (2014) indica a dose de 50-400 mg/L para anestesia em peixes. Logo, para o anestésico MS-222 foram testadas as seguintes concentrações: 100, 200 e 300 mg/L.

Sete repetições foram utilizadas, considerando cada animal uma repetição.

O grupo controle foi exposto à água isenta de anestésico e o tempo de duração calculado a partir da média dos outros tratamentos.

4.2. Indução Hormonal

A indução hormonal foi realizada com aplicação intracavitária de extrato de hipófise de carpa na concentração de três mg/Kg utilizando seringa de insulina (1 mL) e agulha de 13 x

0,45mm. Após 240 horas-grau (10h em uma temperatura de 24°C) os peixes foram colocados em baldes com 10 L de água contendo diferentes concentrações de anestésico.

4.3. Banhos anestésicos

Nos banhos foram utilizados baldes contendo 10 L de água provenientes do tanque onde os animais estavam acondicionados.

Os banhos ocorreram previamente à coleta de sêmen.

Um animal por vez foi retirado cuidadosamente do tanque com um puçá, e acondicionado dentro do balde contendo a concentração anestésica a ser testada.

A indução anestésica seguiu o mesmo parâmetro de indução à anestesia adotado por Vidal et al. (2007) (Tabela 1), com o objetivo de alcançar o estágio de anestesia profunda (IV), no qual o animal perderia o tônus muscular assim como o equilíbrio, sendo observado batimento opercular lento, porém regular. O tempo de indução à anestesia foi monitorado através de um cronômetro digital, sendo quantificado assim o tempo que cada peixe ficou imerso dentro da solução até a perda total de seu movimento e diminuição considerável dos batimentos operculares.

Tabela 1. Estágios de anestesia em peixes

Estágio	Descrição	Resposta Comportamental em Peixes
0	Normal	Reativos a estímulos externos; batimentos operculares normais; reação muscular normal.
I	Sedação Leve	Reativos a estímulos externos; movimentos reduzidos; batimentos operculares mais lentos; equilíbrio normal.
II	Sedação Profunda	Perda total da reatividade aos estímulos externos exceto forte pressão; leve queda do movimento opercular; equilíbrio normal.
III	Narcole	Perda parcial de tônus muscular; natação errática; aumento dos movimentos operculares; reativos apenas a forte estímulo tátil ou vibração.
IV	Anestesia Profunda	Perda total do tônus muscular; perda total do equilíbrio; batimento opercular lento, porém regular.
V	Anestesia Cirúrgica	Ausência total de reação, mesmo a forte estímulo; movimentos operculares lentos e irregulares; batimentos cardíacos lentos; perda total de todos os reflexos.
VI	Colapso Medular	Parada na ventilação; parada cardíaca; morte eventual.

(VIDAL et al. 2007)

4.4. Coleta de Sêmen

Para a coleta de sêmen foi aplicada uma massagem anteroposterior na região abdominal com o peixe levemente inclinado com a cabeça para cima para que se possa coletar o sêmen em seringa de 5 mL. Durante a coleta, o primeiro jato de sêmen foi desprezado e evitou-se possíveis contaminações com fezes, sangue ou urina.

4.5. Coleta de Sangue

Com o animal ainda contido, foi realizada a coleta de sangue com seringa de 3 mL e agulha 25 x 0,7 mm introduzida na região ventral, caudal a região genital, em ângulo de 45°-90° em direção à região ventral da coluna de forma a possibilitar a punção da veia caudal. Um máximo de 3 mL foi coletado de cada animal.

Para mensuração dos níveis hormonais, as amostras de sangue foram transferidas para microtubos (Microvette® 500 µL, soro gel com ativador de coágulo, Sarstedt) para separação do plasma. Os níveis plasmáticos hormonais foram determinados por ensaio imunoenzimático (ELISA) de acordo com o protocolo do fabricante (Estradiol, Testosterona, EIA Kit SYMBIOSIS DIAGNOSTICA LTDA; 17 alfa-hydroxyprogesterone, Cortisol, EIA Kit DBC).

4.6. Contagem diferencial de leucócitos

Um esfregaço sanguíneo foi realizado com 0,2 mL de cada amostra de sangue com a finalidade de determinar a influência do anestésico sobre as células de defesa (BARCELLOS et al., 2000). O diferencial de leucócitos foi realizado de acordo com Ranzani-Paiva, et al. (2013).

4.7. Análise de motilidade e integridade de membrana

A taxa de motilidade (0 a 100%) foi avaliada subjetivamente em microscópio em uma lâmina histológica, na qual se observou a movimentação espermática após ativação com solução de NaCl 58 mM.

Para avaliação da morfologia espermática, as amostras foram fixadas em solução formol tamponado 10% na diluição 1:1000 (sêmen: diluidor). As amostras foram submetidas à técnica de coloração Rosa Bengala (4%) e analisadas em microscópio de luz (100x), observando-se um total de 200 espermatozoides por esfregaço.

A percentagem de células com membrana intacta foi avaliada utilizando os corantes eosina-nigrosina. O sêmen foi diluído (1:100) em solução de Ginsburg Fish Ringer (Cloreto de sódio - NaCl (6,50g), Cloreto de potássio - KCl (0,250g), Cloreto de cálcio dihidratado - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,350g), Bicarbonato de sódio - NaHCO_3 (0,20g) em 1000mL de água destilada, pH 7,5; 300mOsm) (GINSBURG, 1963). Posteriormente 20 μL desta diluição foram misturados a 20 μL do corante para realização do esfregaço em lâmina histológica e avaliação de 200 espermatozoides por lâmina. Os espermatozoides que apresentam a cabeça não corada são considerados intactos e os espermatozoides que apresentam a cabeça corada são considerados não-intactos.

4.8. Análise estatística

A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk e de homogeneidade pelo teste de Levene. Quando necessário, os dados foram transformados (LOG) na tentativa de alcançar a anormalidade. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparação de médias de Tukey, a 5% de significância. Os dados que não apresentaram distribuição normal mesmo após transformações foram analisados por meio da análise não paramétrica de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn, a 5% de significância. Para a estatística, foram utilizados os softwares Statistical Analysis System 9.4 (SAS) e GraphPad Prism 7.0

5. RESULTADOS

O tempo de indução à anestesia foi significativamente maior ($P=0,0145$) no tratamento de 100 mg/L de MS-222 ($440,14 \pm 51,32$ s) comparado aos tratamentos de 200 mg/L ($283,43 \pm 46,35$ s) e 300 mg/L ($243,38 \pm 29,54$ s).

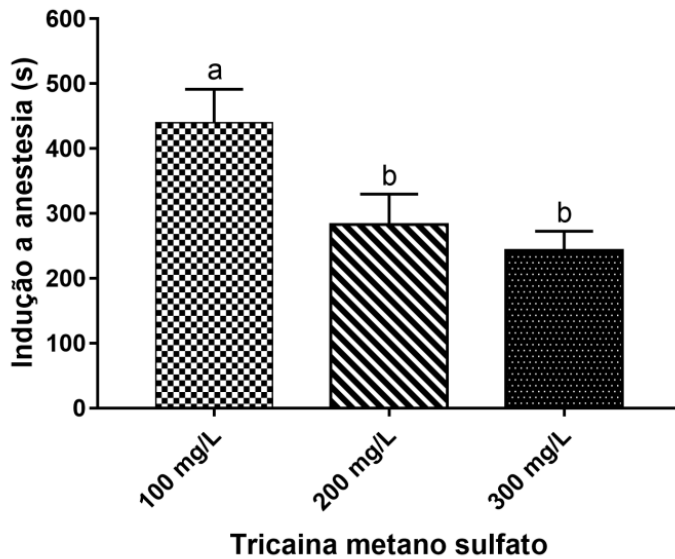


Fig1. Média do tempo de indução à anestesia (segundos) de reprodutores de *R. quelen*, submetido três concentrações de MS-222 (100, 200 e 300 mg/L). * Valores com diferença estatística pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) estão representados por letras diferentes. Barras de erro representam o erro padrão da média.

A concentração de cortisol plasmático não diferiu entre os tratamentos 100 ($143,43 \pm 24,97$ ng/mL), 200 ($138,29 \pm 23,20$ ng/mL) e 300 mg/L ($182,50 \pm 42,03$ ng/mL) e com o grupo controle ($96,86 \pm 7,08$ ng/mL).

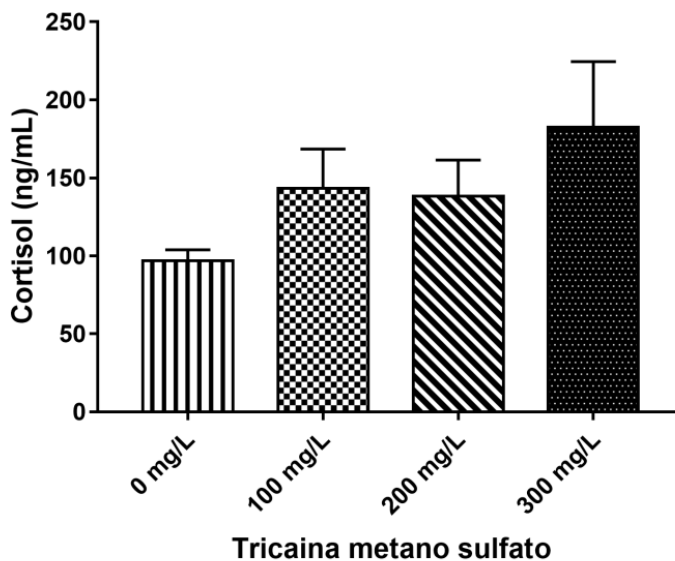


Fig2. Cortisol plasmático (ng/mL) dos reprodutores de *R. quelen*, submetidos a quatro concentrações de MS-222 (0, 100, 200 e 300 mg/L). Barras de erro representam o erro padrão da média.

Não houve diferença significativa na contagem diferencial de leucócitos entre os tratamentos (100, 200, 300 mg/L) e com o grupo controle.

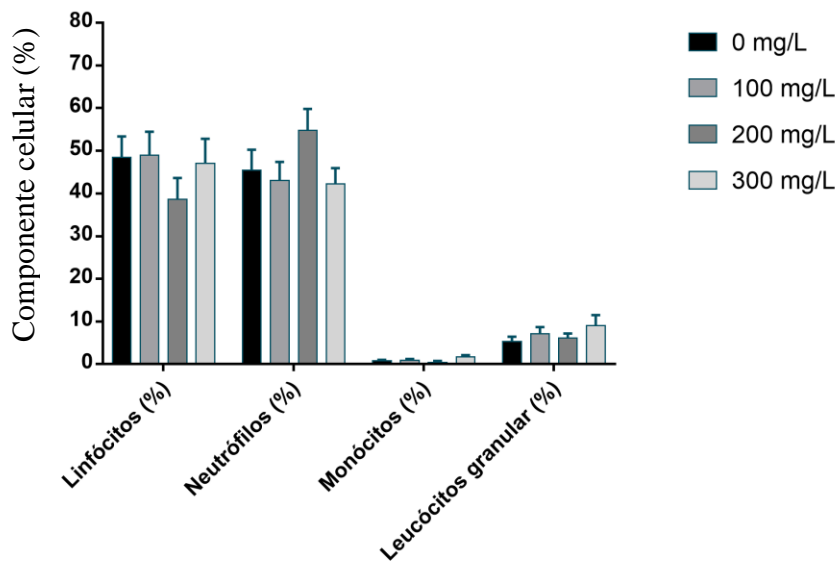


Fig3. Contagem diferencial de leucocitos (%) sanguíneos em machos reprodutores de *R. quelen*, submetidos a quatro concentrações de MS-222 (0, 100, 200 e 300 mg/L). Barras de erro representam o erro padrão da média.

Não houve diferença significativa na percentagem de integridade de membrana dos espermatozoides entre os tratamentos 100 ($19,29 \pm 3,78\%$), 200 ($19,93 \pm 2,40\%$) e 300 mg/L ($23,21 \pm 3,52\%$) e com o grupo controle ($27,86 \pm 5,32\%$).

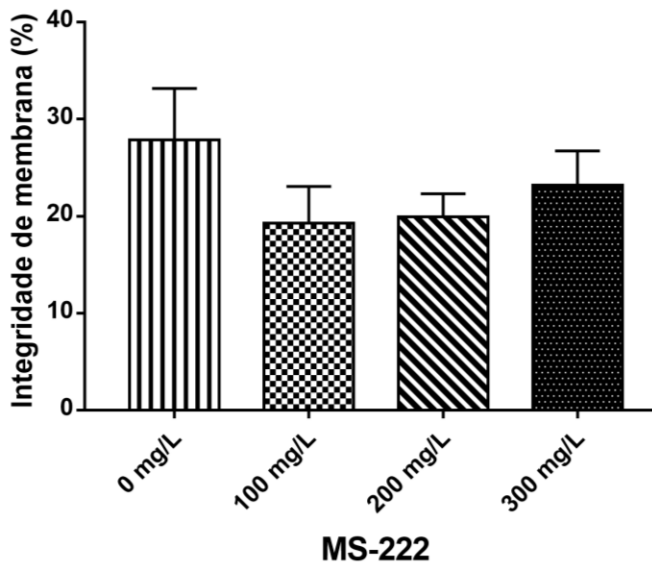


Fig4. Integridade de membrana espermática (%) em sêmen de reprodutores de *R. quelen*, submetidos a quatro concentrações de MS-222 (0, 100, 200 e 300 mg/L). Barras de erro representam o erro padrão da média.

Não houve diferença significativa na avaliação da morfologia espermática entre os tratamentos 100, 200 e 300 mg/ L e o grupo controle.

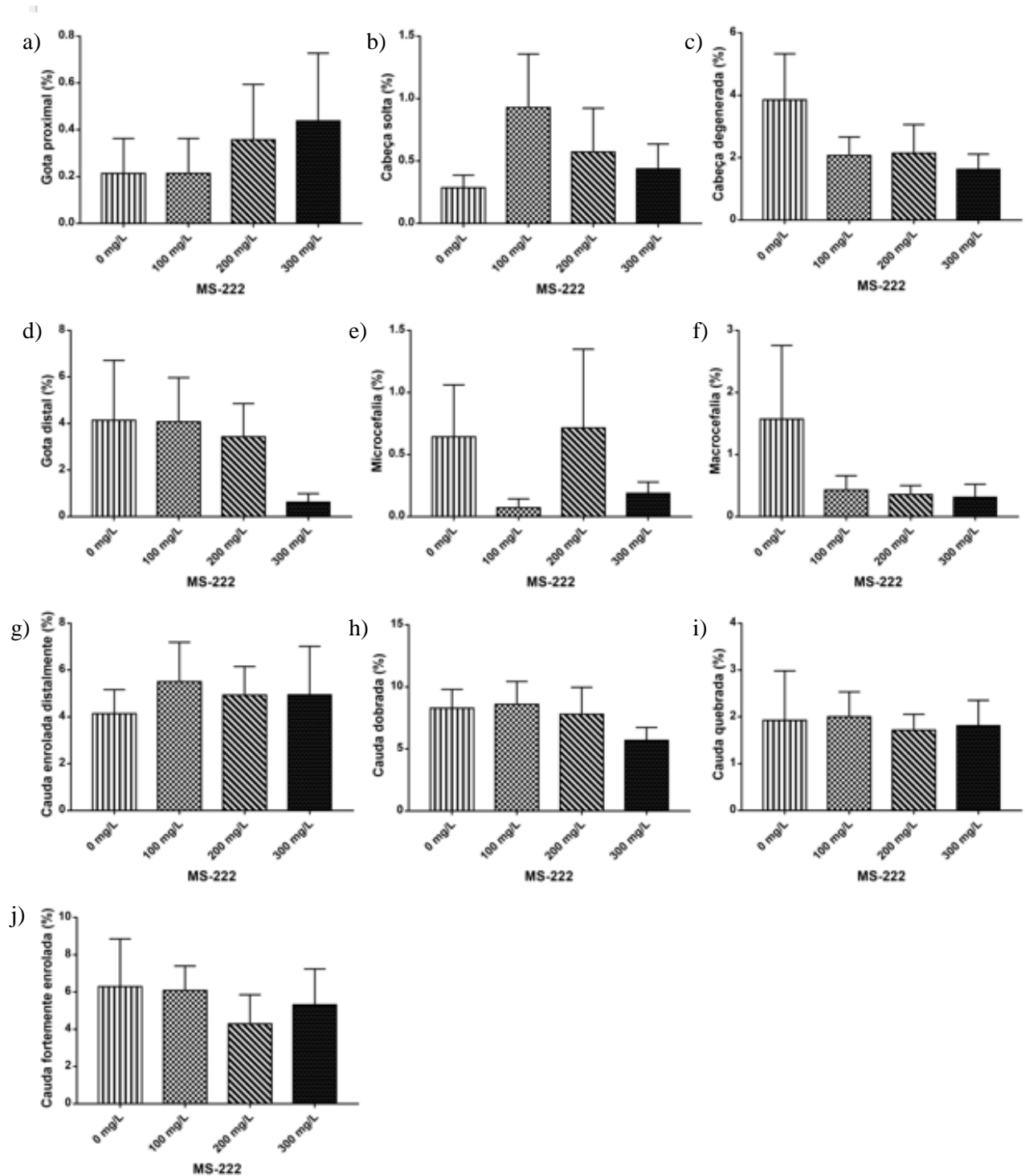


Fig5. Morfologia espermática de reprodutores (%) em sêmen de reprodutores de *R. quelen*, submetidos a quatro concentrações de MS-222 (0, 100, 200 e 300 mg/L). (a) gota proximal; (b) cabeça solta; (c) cabeça degenerada; (d) gota distal; (e) microcefalia; (f) macrocefalia; (g) cauda enrolada distalmente; (h) cauda dobrada; (i) cauda quebrada; (j) cauda fortemente enrolada.

A taxa de motilidade espermática do grupo controle ($90,00 \pm 4,47\%$) foi superior aos tratamentos, no entanto, somente diferiu ($P < 0,05$) do tratamento com a concentração mais alta de MS-222 (300 mg/L ; $66,25 \pm 5,65\%$).

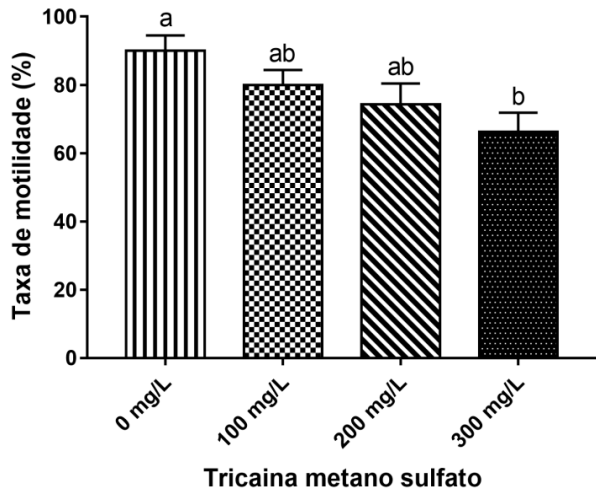


Fig6. Taxa de motilidade espermática (%) dos machos reprodutores de *R. quelen*, submetidos a quatro concentrações de MS-222 (0, 100, 200 e 300 mg/L)* Valores com diferença estatística pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) estão representados por letras diferentes.

Na avaliação do nível de estradiol, houve diferença significativa ($P = 0,0309$) entre o grupo controle ($118,90 \pm 21,22 \text{ ng/mL}$) e a concentração de 200 mg/L ($54,71 \pm 7,55 \text{ ng/mL}$).

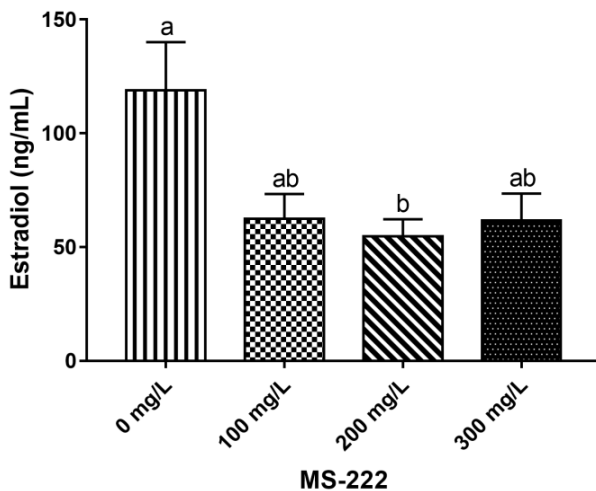


Fig7. Concentração de estradiol plasmático (ng/mL) em machos reprodutores de *R. quelen*, submetido quatro concentrações de MS-222 (0, 100, 200 e 300 mg/L). * Valores com diferença estatística pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) estão representados por letras diferentes. Barras de erro representam o erro padrão da média. Comparação entre médias pelo teste Kruskal-Wallis.

Para os hormônios testosterona e 17- α -hydroprogesterona não houve diferença significativa entre os tratamentos e com o grupo controle.

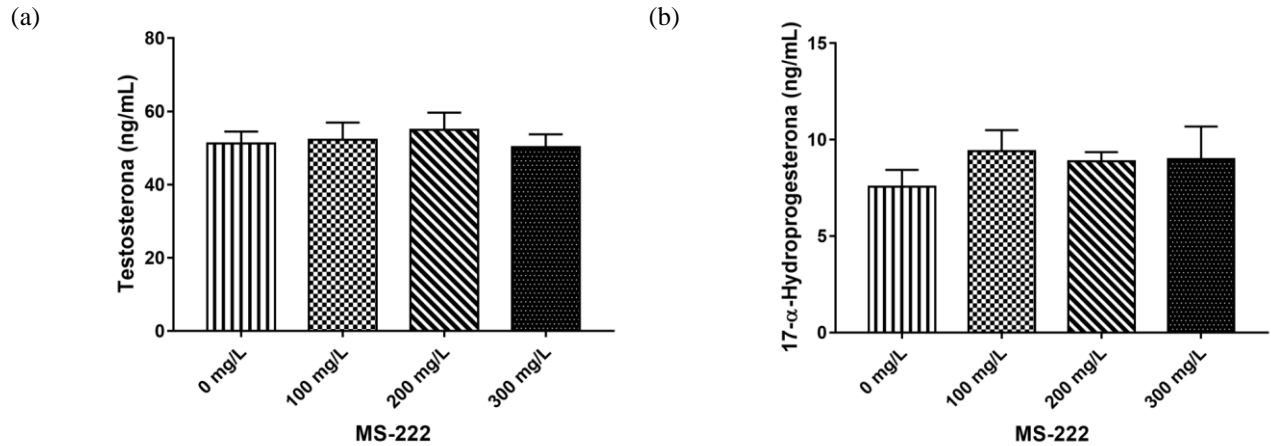


Fig8. Concentração plasmática (ng/mL) de testosterona (a) e 17- α -hydroprogesterona (b) em machos reprodutores de *R. quelen*, submetido a quatro concentrações MS-222 (0, 100, 200 e 300 mg/L). Barras de erro representam o erro padrão da média. Comparação entre médias pelo teste Kruskal-Wallis.

6. DISCUSSÃO

Em um estudo com Chanel catfish (*Ictalurus punctatus*) com peso ao redor de 12 g, após 10 min de sedação com MS-222 na dose de 100 mg/L as concentrações de cortisol foram aproximadamente sete vezes mais altas do que as concentrações basais. Esses autores sugerem que o MS-222 é um anestésico mais apropriado para uso durante os 5 minutos iniciais de sedação (SMITH et al., 2015), pois durante esse tempo o anestésico foi capaz de atenuar o aumento de cortisol plasmático. Tanto na medicina humana como na veterinária, a anestesia é muitas vezes precedida pela administração de um sedativo para acalmar o paciente e reduzir qualquer estresse que possa ser causado pelo anestésico ou pelo procedimento anestésico (POPOVIC et al., 2012). Portanto, o próprio MS-222 pode agir aumentando os níveis de cortisol, mesmo quando os peixes não são submetidos a estressores físicos. Isso pode ocorrer devido as propriedades químicas do fármaco que podem ser sentidas pelo animal na água ou pelo próprio procedimento de anestesia. No presente estudo, foi observado aumento dos valores de cortisol acompanhando o aumento da

concentração do anestésico, apesar de haver diferença significativa, essa alteração pode ser explicada por estes fatores.

A concentração basal de cortisol em machos de *R. quelen* é 15,86 ng/mL, após estresse agudo a concentração passa para 158,12 ng/mL (BARCELLOS et al., 2001). Os valores máximos oscilam entre 158,0 (machos) e 207,0 ng/mL (fêmeas), sempre uma hora após a captura e transferência de tanques (BARCELLOS et al., 2000). No presente estudo, os animais do grupo controle apresentaram o valor médio de cortisol de $96,86 \pm 7,08$ ng/mL identificando um estado de estresse agudo que pode ter sido causado pela indução hormonal realizada aproximadamente 10 h antes das coletas de sêmen e sangue. Além disso, as três concentrações de MS-222 testadas não reduziram a concentração de cortisol plasmático. O mesmo foi observado no trabalho Palić et al. (2005), no qual foi observado que o MS-222 não foi capaz de impedir o aumento do cortisol em peixes da espécie *Pimephales promelas*. É possível, que possa ter ocorrido um aumento de resposta ao estresse durante o procedimento anestésico devido à baixa disponibilidade de oxigênio causada pela ventilação branquial insuficiente, ou pela estimulação direta do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI) (BOLASINA, 2006). Durante a exposição a MS-222, o tempo levado para atingir o estágio I da anestesia pode proporcionar tempo para que os peixes detectem o agente anestésico na água devido as propriedades químicas muito distintas que poderiam ser sentidas através do paladar e do olfato do animal, além de haver a possibilidade de atuar como irritante para a pele. Além disso, à medida que o anestésico começa a fazer efeito, a perda de equilíbrio também pode provocar uma resposta ao estresse (POPOVIC et al., 2012).

Ainda não há conhecimento suficiente para definir quando os limites das flutuações homeostáticas foram ultrapassados, levando ao estresse (SCHRECK, 2010). Desse modo, apesar do nível de cortisol circulante ser o indicador mais avaliado afim de se mensurar resposta ao estresse nos peixes, este deve ser interpretado com o auxílio da determinação conjunta de outras variáveis fisiológicas, como o nível de glicose e cloreto no plasma, por exemplo, que servem também como indicadores do nível da resposta aos estressores (WAGNER et al., 2002). Dessa forma, é preciso considerar o maior número de variáveis possível na determinação da presença de estresse, pois a amplitude dos parâmetros considerados fisiológicos em peixes ainda não foi totalmente elucidada, inferindo que a análise de cortisol isoladamente não seja a melhor forma de avaliar a resposta ao estresse.

Acredita-se que os efeitos nocivos do estresse sobre a resposta imune sejam preferencialmente mediados pelos efeitos supressores dos glicocorticoides, ou seja, cortisol (NARDOCCI et al., 2014). Tavares-Dias et al. (2002) avaliaram os parâmetros hematológicos de jundiá (*Rhamdia quelen*), e identificaram que trombócitos e linfócitos foram as células de defesa orgânica mais frequentes, sendo o linfócito o maior representante dos leucócitos. No trabalho de Barcellos et al (2004) foi demonstrado que o estresse agudo em jundiá (*Rhamdia quelen*) pode causar redução no número de linfócitos circulantes, monócitos e células granulocíticas especiais (SGC), assim como a porcentagem de neutrófilos circulantes pode aumentar. No presente trabalho, apesar da contagem diferencial de leucócitos não ser significativa, é possível perceber um discreto aumento do número de neutrófilos em relação a porcentagem de linfócitos no sangue. O que pode demonstrar uma pequena alteração na composição de leucócitos circulantes.

O aumento do cortisol está associado a redução da motilidade espermática, pois, em machos de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), devido ao confinamento isolado em tanques pequenos, ocorreu significativa elevação de cortisol e diminuição da motilidade espermática (BOBE E LABBÉ, 2010). É possível ainda que os hormônios do estresse possam interferir na osmolaridade do plasma e, afetando a qualidade espermática (RURANGWA et al., 2004). Assim como o ocorrido em machos maduros de perca branca (*Morone chrysops*), que foram submetidos a estresse agudo durante a captura e transporte, resultando em redução da osmolaridade seminal e, conseqüentemente, diminuição da taxa de motilidade (ALLYN et al., 2001). Além do cortisol, anestésicos também podem interferir neste parâmetro, pois o contato direto entre o MS-222 e o espermatozoide diminuiu o tempo de duração da motilidade espermática de machos de truta arco-íris (*O. mykiss*), a taxa de motilidade, no entanto, não foi afetada (WAGNER et al., 2002). No presente trabalho, as taxas de motilidade foram inversamente proporcionais ao aumento de concentração de anestésico e de cortisol plasmático. Sugerindo que este resultado pode estar relacionado ao contato direto do sêmen com a pele do animal, que poderia conter resquício do fármaco. Outra explicação seria a ação direta do cortisol nas gônadas interferindo funcionalidade das células espermáticas.

Um estudo realizado com fêmeas de *Rhamdia quelen* demonstrou que altos níveis de cortisol plasmático acarretaram menores concentrações de 17 β -estradiol plasmático (SOSO et al., 2008). Esses autores sugeriram a possibilidade de um efeito inibitório do estradiol sobre a aromatase, enzima que converte testosterona em estradiol. Fato que corrobora com os resultados

obtidos no presente trabalho para a dosagem de 17 β -estradiol sérico, encontrado em menor concentração nos animais com maior nível de cortisol plasmático.

7. CONCLUSÃO

O uso do anestésico MS-222 na concentração de 200 mg/L reduziu os níveis de estradiol plasmático. Ainda, ocorreu a diminuição da taxa de motilidade espermática em todas as concentrações testadas (100, 200 e 300 mg/L) em machos de jundiá. Além disso, as três concentrações de MS-222 utilizadas não reduziram a concentração de cortisol plasmático, provavelmente devido ao tempo levado para atingir o estágio necessário para a anestesia profunda, proporcionando maior percepção dos componentes químicos do fármaco pelos peixes. Para uma melhor compreensão de como o MS-222 influencia a reprodução de machos de jundiá, sugerimos que novos estudos sejam realizados testando outros intervalos de concentrações anestésicas e que outros parâmetros reprodutivos e de resposta ao estresse sejam avaliados.

REFERÊNCIAS

- ADEL, M. et al. Anesthetic Efficacy of Clove Oil, Propofol, 2-Phenoxyethanol, and Ketamine Hydrochloride on Persian Sturgeon, *Acipenser persicus*, Juveniles. **Journal of the World Aquaculture Society**, [s.l.], v. 47, n. 6, p.812-819, abr. 2016. Wiley.
- ALLYN, M.L., SHEEHAN, R.J., KOHLER, C.C. The effects of capture and transportation stress on white bass semen osmolality and their alleviation via sodium chloride. **Trans. Am. Fish. Soc.** V.130, p. 706–711. 2001.
- ATTILI, S.; HUGHES, S.M. Anaesthetic Tricaine Acts Preferentially on Neural Voltage-Gated Sodium Channels and Fails to Block Directly Evoked Muscle Contraction. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 8, p.1-2, 4 ago. 2014. Public Library of Science (PLOS).
- BARBOSA, L.G.; MORAES, G.; INOUE, L.A.K.A. Respostas metabólicas do matrinxã submetidos a banho anestésico de eugenol. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.29, p.255-260, 2007.
- BARCELLOS, L. J. G.; SOUZA, S. M. G.; WOEHLE, V. M. Estresse em peixes: fisiologia da resposta ao estresse, causas e consequências (revisão). **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 26, n. 1, p. 99-111, 2000.
- BARCELLOS, L.J.G. et al. Plasma levels of cortisol and glucose. In response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 32, n. 2, p. 121-123, 2001.
- BARCELLOS, L.J.G. et al. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. **Aquaculture**, [s.l.], v. 237, n. 1-4, p.229-236, ago. 2004. Elsevier BV.
- BARTON, B. A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, p. 517-525, 2002.
- BARTON, B. A. AND G. K. IWAMA. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the responses and effects of corticosteroids. **Annual Rev. of Fish Disease**, EUA. v.1, p. 3-26, 1991.
- BOBE, J.; LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, [s.l.], v. 165, n. 3, p.535-548, fev. 2010. Elsevier BV.
- BOLASINA, S. N. Cortisol and hematological response in Brazilian codling, *Urophycis brasiliensis* (Pisces, Phycidae) subjected to anesthetic treatment. **Aquaculture International**, v. 14, p. 569-575, 2006.

BOMBARDELLI, R.A.; MÖRSCHBÄCHER, E.F.; CAMPAGNOLO, R. et al. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1251-1257, 2006.

BROWN, L.A. Anaesthesia for fish. **Vietfish**. [s.l.], p. 68-70. mar. 2011.

CAMPBELL, P.M.; POTTINGER, T.G.; SUMPTER, J.P. Preliminary evidence that chronic confinement stress reduces the quality of gametes produced by brown and rainbow trout. **Aquaculture**, [s.l.], v. 120, n. 1-2, p.151-169, fev. 1994. Elsevier BV.

CARMICHAEL, et al. Characterization and alleviation of stress associated with hauling largemouth bass. **Transactions of the American Fisheries Society** 113:778-785, 1984.

CARNEIRO, P.C.F. et al. PROCESSAMENTO DO JUNDIÁ *Rhamdia quelen*: RENDIMENTO DE CARÇAÇA. **Revista Acadêmica: ciências agrárias e ambientais**, Curitiba, v. 3, n. 2, p.11-17, set. 2004.

CARTER, K.M.; WOODLEY, C.M.; BROWN, R.S. A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish. **Reviews In Fish Biology And Fisheries**, [s.l.], v. 21, n. 1, p.51-59, 31 dez. 2010. Springer Nature.

CHO, G.K.; HEATH, D.D. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). **Aquaculture Research**, [s.l.], v. 31, n. 6, p.537-546, jun. 2000. Wiley.

CONROY. C.J. et al. Use of Tricaine Methanesulfonate (MS222) for Euthanasia of Reptiles. **Journal of the American Association For Laboratory Animal Science**. Califórnia, p. 28-32. jan. 2009.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Resolução Nº 1000, de 11 de maio de 2012. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Resolução Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA. Brasília.

COYLE, S.D.; DURBOROW, R.M.; TIDWELL, H.J. Anaesthetics in Aquaculture. SRAC Publication No. 3900. **Southern Regional Aquaculture Center**, USA. 2004

DAVIS, K.B. et al. Effect of handling stress on susceptibility of channel catfish *Ictalurus punctatus* to *Ichthyophthirius multifiliis* and channel catfish virus infection. **Aquaculture**, v.214, p.55-66, 2002.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome: FAO, 2016.

FEIDEN, A., et al. Desempenho de juvenis de jundiás submetidos à alimentação com ração orgânica certificada e comercial. *Revista Acadêmica, Ciências Agrárias e ambientais*, v. 8, n. 4, p. 381-387, 2010.

GHIRALDELLI, L.; Desenvolvimento gonadal do jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei, Siluriformes), em viveiros de terra, na região sul do Brasil. *Acta Scientiarum*. Biological Sciences. Universidade Estadual de Maringá, Brasil, vol. 29, núm. 4, p. 349-356, 2007.

GOMES, L. C. et al. BIOLOGIA DO JUNDIÁ *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, PIMELODIDAE). *Ciência Rural*. Santa Maria, p. 179-185. jan. 2000.

GRESSLER, L. T. et al. Immersion anaesthesia with tricaine methanesulphonate or propofol on different sizes and strains of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Journal Of Fish Biology*, [s.l.], v. 81, n. 4, p.1436-1445, set. 2012.

GINSBURG, A.S. Sperm-egg association and its relationship to the activation of the egg in salmonid fishes. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, v.11, p.13-33, 1963.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Prod. Pec. munic., Rio de Janeiro, v. 44, p.1-51, 2016.

IVERSEN, M. et al. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S™ and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture*, [s.l.], v. 221, n. 1-4, p.549-566, maio 2003. Elsevier BV.

MARICCHIOLO, G.; GENOVESE, L. Some contributions to knowledge of stress response in innovative species with particular focus on the use of the anaesthetics. *The Open Marine Biology Journal*, v. 5, p. 24-33, 2011.

MENDES, J.M.; INOUE, L.A.K.A.; JESUS, R.S. Influência do estresse causado pelo transporte e método de abate sobre o rigor mortis do tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Brazilian Journal Of Food Technology*, [s.l.], v. 18, n. 2, p.162-169, jun. 2015. FapUNIFESP (SciELO).

NARDOCCI, G. et al. Neuroendocrine mechanisms for immune system regulation during stress in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, [s.l.], v. 40, n. 2, p.531-538, out. 2014. Elsevier BV.

NEIFFER, D. L.; STAMPER, M. A. Fish sedation, anaesthesia, analgesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, v. 50, n. 4, p. 343-360, 2009.

PAIVA, P.D. Compostagem: Destino correto para animais mortos e restos de parição. *Embrapa Suínos e Aves – Concórdia – SC*, p.38, 2005.

PALÍ, D. et al. Anesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol: Effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas Rafinesque, 1820*). *Aquaculture*, [s.l.], v. 254, n. 1-4, p.675-685, abr. 2006. Elsevier BV.

- PARK, M. O. et al. Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil anaesthetized kelp grouper *Epinephelusbruneus*. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 877-884, 2008.
- PEREIRA-DA-SILVA, E. M. et al. Efeito anestésico do óleo de cravo em alevinos de lambari. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1851-1856, 2009.
- POPOVIC, N. Topic et al. Tricaine methane-sulfonate (MS-222) application in fish anaesthesia. **Journal Of Applied Ichthyology**, [s.l.], v. 28, n. 4, p.553-564, 28 fev. 2012. Wiley.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T. et al. Métodos para análise hematológica em peixes. Maringá: **Universidade Estadual de Maringá**, p. 140, 2013.
- ROUBACH, R.; GOMES, L.C. O uso de anestésicos durante o manejo de peixes. **Panorama da Aquicultura**, p. 37-40. 2001.
- RURANGWA, E. et al. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture**, [s.l.], v. 234, n. 1-4, p.1-28, maio 2004. Elsevier BV.
- SAINT-ERNE, N. Tranquilisation, anaesthesia and euthanasia in pet fish. **Companion Animal**. p. 658-662. dez. 2014.
- SCHRECK, C.B. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. **General And Comparative Endocrinology**, [s.l.], v. 165, n. 3, p.549-556, fev. 2010.
- SCHRECK, C.B.; CONTRERAS-SANCHEZ, W., FITZPATRICK, M.S. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. **Aquacult.** V. 197, p. 3-24, 2001.
- SOSO, et al. The Effects of Stressful Broodstock Handling on Hormonal Profiles and Reproductive Performance of *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) Females. *Journal of the World Aquaculture Society*. Passo Fundo, v. 39, n. 6, dec. 2008.
- SMITH, M. S. et al. Analysis of Short-Term Cortisol Stress Response in Channel Catfish by Anesthetization with Metomidate Hydrochloride and Tricaine Methanesulfonate. **Journal Of Aquatic Animal Health**, [s.l.], v. 27, n. 3, p.152-155, 3 jul. 2015. Wiley.
- SNEDDON, L. U. Clinical anesthesia and analgesia in fish. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 21, p. 32-43, 2012.
- TAVARES-DIAS, M., et al. HAEMATOLOGICAL CHARACTERISTICS OF BRAZILIAN TELEOSTS.VI. PARAMETERS OF JUNDIÁ *Rhamdia quelen* (PIMELODIDAE). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.4, p.693-698, 2002.
- TORT, L. Stress and immune modulation in fish. **Developmental & Comparative Immunology**, [s.l.], v. 35, n. 12, p.1366-1375, dez. 2011. Elsevier BV.

VIDAL, et al. Eugenol como anestésico para juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.8, n.4, p. 335-342, out/dez, 2007

VIDAL, et al. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. **Pesq. agropec. bras**, Brasília, v.43, n.8, p.1069-1074, ago. 2008

WAGNER, E.; ARNDT, R.; HILTON, B. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 211, n. 1-4, p. 353–366, 2002.

WEBB, R et al. MS-222 (tricaine methane sulfonate) does not kill the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Diseases Of Aquatic Organisms**, [s.l.], v. 68, p.89-90, 2005. Inter-Research Science Center.

WEIRICH, C.R. Transportation and Stress Mitigation. Pages 185-216 in R.M. Harrell, editor. *Striped bass and other Morone culture*. **Elsevier**, New York, 1997.

WELKER, T. L. et al. Effect of Buffered and Unbuffered Tricaine Methanesulfonate (MS-222) at Different Concentrations on the Stress Responses of Channel Catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. **Journal of Applied Aquaculture**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.1-18, 9 ago. 2007.

WENDELAAR BONGA, S. E. W. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, [s.l.], v. 77, n. 3, p.591-625, jul. 1997. American Physiological Society.