

EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO DURANTE A FASE JUVENIL SOBRE PARÂMETROS REPRODUTIVOS EM ADULTOS DE TRUTA ARCO-ÍRIS

(*Oncorhynchus mykiss*)

Arno Juliano BUTZGE^{1,5}, Ricardo Shohei HATTORI², Túlio Teruo YOSHINAGA³, Yara Aiko
TABATA⁴, Claudio de OLIVEIRA¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Genética. Instituto de Biociências de Botucatu, IBB-UNESP.

² Pesquisador visitante/Programa Jovem Pesquisador FAPESP/APTA, UPD Campos do Jordão - SP

³ Departamento de cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ-USP, São Paulo - SP

⁴ Pesquisador científico Instituto de Pesca - Estação Experimental de Salmonicultura - Campos do Jordão - SP

⁵ Endereço/Address: Estação Experimental de Salmonicultura, Parque Estadual de Campos do Jordão - Campos do Jordão - SP, CEP: 12460-000. e-mail: arno.butzge@unesp.br

Palavras-chave: Espermatogênese; espermatogônias-tronco; temperatura.

INTRODUÇÃO

Em peixes, exposições crônicas a altas temperaturas podem afetar a proliferação, diferenciação ou mesmo a sobrevivência das células germinativas, comprometendo a fertilidade e, portanto, a capacidade reprodutiva das espécies, levando à geração de animais completamente ou parcialmente estéreis (ITO *et al.*, 2008). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do estresse térmico prolongado em juvenis machos (fase espermatogonial/proliferativa da espermatogênese) sobre os parâmetros reprodutivos em adultos de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).

MATERIAL E MÉTODOS

De janeiro a março de 2017, 100 animais com seis meses de idade foram divididos em quatro grupos, sendo dois grupos de 25 animais para o controle, mantidos entre 15 e 17°C na Estação Experimental de Salmonicultura de Campos do Jordão-SP (EES), e dois grupos de 25 animais mantidos entre 20 e 22°C no Sítio Forelle (Pindamonhangaba, SP). Os animais foram alocados em caixas d'água de 250 litros, alimentados *ad libitum* com ração comercial e submetidos a fotoperíodo natural de 14h de luz e 10h de escuridão. Após 90 dias, os animais remanescentes do tratamento a alta temperatura foram retornados à EES e mantidos sob as mesmas condições do grupo controle. No período reprodutivo, aos dois anos de idade (junho-agosto/2018) foram realizadas as coletas dos gametas para a avaliação do desempenho reprodutivo: volume de sêmen liberado (mL) e concentração de

espermatozoides (espermatozoides mL^{-1}) determinada pela contagem em câmara de Neubauer, mediante diluição do sêmen em paraformoldeído (4%).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores das temperaturas mínimas e máximas da água durante o experimento variaram de 17,3°C e 22,9°C em Pindamonhangaba-SP, e de 12,3°C e 17,40°C em Campos do Jordão-SP, respectivamente. Os limites críticos da temperatura da água de sobrevivência da truta arco-íris estão entre 0 e 25°C, sendo as temperaturas de cultivo recomendadas entre 10 e 20°C e de reprodução próximas a 10°C. Portanto, as temperaturas as quais as trutas foram submetidas no sítio Forelle ficaram acima do recomendado, tornando esse fator um agente estressor. Após a maturação sexual observou-se uma diferença significativa tanto no peso quanto no comprimento dos animais, sendo menor, para ambos, no grupo tratado. Além disso, o fator de condição, também foi significativamente maior no grupo tratado (Figura 1 A-C).

O volume de sêmen liberado, relativo ao peso do animal, mostrou diferença ($p=0,0027$) entre os grupos, sendo menor no grupo submetido ao estresse térmico, que apresentou uma média de 5,86 $\mu\text{L g}^{-1}$. No grupo controle foi obtido uma média de 9,55 $\mu\text{L g}^{-1}$ (Figura 1E). Ao analisarmos a concentração de espermatozoides por mL de sêmen liberado, não observamos diferença significativa ($p=0,13$) entre os grupos, os quais apresentaram uma média de $19,9 \times 10^9$ e $16,6 \times 10^9$ para o grupo controle e grupo tratado, respectivamente (Figura 1D). Os valores de volume e concentração espermática estão dentro do esperado para a espécie. Ao final do período reprodutivo, os machos utilizados nos cruzamentos (2 do grupo controle e 2 do tratado) e os animais que não atingiram a maturidade sexual (4 dos 8 animais) foram eutanasiados para análise anatômica e morfológica das gônadas. Os testículos dos machos submetidos ao estresse térmico apresentaram tamanho menor comparado com o grupo controle, com índice gonadossomático (IGS) médio de 1,63% e 2,32%, respectivamente. Ao analisar a histologia dessas gônadas, não foram observadas diferenças notáveis entre as mesmas.

Interessantemente, somente o grupo tratado apresentou machos que não atingiram a maturidade sexual. Estes animais não apresentavam características fenotípicas de machos maduros, como coloração da pele e mandíbula prognata. Suas gônadas apresentavam um aspecto anormal, altamente hemorrágico, dificultando a identificação. Por isso foi necessário confirmar o sexo genético destes por análise molecular utilizando a amplificação do gene *SDY* (YANO *et al.*, 2012). A média do IGS desse grupo foi de 0,055%, valor similar ao IGS de machos imaturos de um ano de idade. Na análise histológica dessas gônadas, observou-se a

presença massiva de espermatogônias do tipo “A” com ausência ou reduzida presença de células em outras fases de desenvolvimento celular. Observou-se ainda grande quantidade de vasos sanguíneos de maior calibre e células imunológicas.

O fato dos animais tratados, mesmo em tamanho e idade aptos em período reprodutivo, apresentarem basicamente células germinativas indiferenciadas, sugere que a alta temperatura induziu alguma forma de quiescência nas gônadas desses animais. Os resultados apresentados claramente demonstram um efeito do estresse térmico no desenvolvimento testicular, porém os dados obtidos até o momento não permitem esclarecer se esta falha no desenvolvimento é decorrente dos efeitos da temperatura nas células somáticas ou diretamente nas células germinativas.

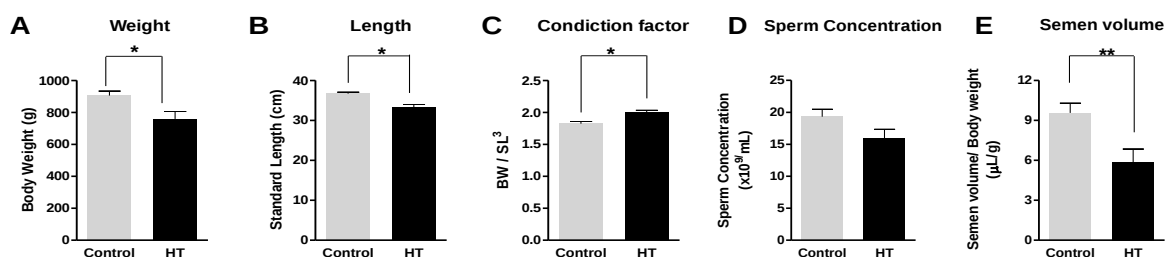


Figura 1. Desempenho reprodutivo de machos de truta arco-íris aos 2 anos de idade. Colunas brancas grupo controle, colunas pretas, machos submetidos por 90 dias a estresse térmico aos 6 meses de idade. (A) peso dos animais em gramas; (B) comprimento dos animais em centímetros; (C) fator de condição – razão entre o peso e o comprimento elevado a 3ª potência; (D) número estimado de espermatozoides por mL de sêmen liberado; (E) volume de sêmen liberado (μL) por grama (g) de peso do animal. Os asteriscos (*) representam diferença estatística ($p < 0,05$) (**) representam diferença estatística ($p < 0,01$). Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ erro padrão.

REFERÊNCIAS

- ITO, L. S.; CORNEJO, A. M.; YAMASHITA, M.; STRÜSSMANN, C. A. 2008 Thermal Threshold and Histological Process of Heat-Induced Sterility in Adult Pejerrey (*Odontesthes bonariensis*): A Comparative Analysis of Laboratory and Wild Specimens. *Physiological and Biochemical Zoology*, 81(6): 775–784.
- YANO, A.; GUYOMARD, R.; NICOL, B.; JOUANNO, E.; QUILLET, E.; KLOPP, C.; CABAU, C.; BOUCHEZ, O.; FOSTIER, A.; GUIGUEN, Y. 2012 An Immune-Related Gene Evolved into the Master Sex-Determining Gene in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Current Biology*, 22 (15):1423–1428.