

Protocolo para Avaliação da Viabilidade de Monogenéticos e Protozoários Parasitos de Peixes por meio das Sondas Fluorescentes SYBR-14 e Iodeto de Propídio (IP)

Rodrigo Yudi Fujimoto¹
Carina Caroline Silva França²
Natalino da Costa Sousa³
Daniela Aparecida de Castro Nizio⁴
Arie Fitzgerald Blank⁵
Paulo César Falanghe Carneiro⁶
Alexandre Nizio Maria⁷

Introdução

A intensificação da produção aquícola tem ocasionado o aparecimento de surtos de doenças devido a quebra do equilíbrio entre patógeno-hospedeiro-ambiente, provocando altas taxas de mortalidade e prejuízos econômicos e ambientais.

Dentre os agentes patogênicos de importância para piscicultura estão o *Ichthyophthirius multifiliis*, que causa a doença dos pontos brancos, popularmente denominado de ictio, e os helmintos monogenéticos que parasitam brânquias e pele.

Estudos sobre boas práticas de manejo e profilaxia são imprescindíveis para o sucesso da cadeia produtiva no intuito de se prevenir a ocorrência das doenças e, para isso, produtos de uso terapêutico precisariam estar disponíveis para o produtor.

Atualmente, segundo dados do compêndio de produtos veterinários do sindicato das indústrias de produtos para saúde animal, somente um parasiticida específico a essa finalidade se encontra disponível no mercado nacional. Estudos de eficácia de produtos químicos sobre estes parasitos são necessários para controle de qualidade de parasiticidas disponíveis e validação de novos produtos para tratamento.

Nos estudos de eficácia é necessária a utilização de métodos rápidos e simples para a diferenciação de parasitos vivos e mortos (ou íntegros e lesados). A estimativa da viabilidade dos parasitos por meio da visualização da sua mobilidade tem sido mencionada em muitos trabalhos científicos. Embora simples, eles são imprecisos, pois alguns parasitos podem estar imóveis, porém não estarem mortos, ou ainda estarem móveis, mas não funcionais ou em processo de morte.

¹Zootecnista, doutor em Aquicultura, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

²Graduanda em Biologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE

³Engenheiro de Pesca, mestre em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, Belém, PA

⁴Engenheira-agrônoma, doutora em Biotecnologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE

⁵Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitotecnia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE

⁶Engenheiro-agrônomo, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

⁷Zootecnista, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

Assim, neste documento, será descrito o passo a passo de uma metodologia utilizada para avaliação da integridade e funcionalidade da membrana plasmática dos parasitos por meio da técnica de fluorescência, de modo que a mortalidade seja constatada não apenas pela imobilidade.

O protocolo proposto neste estudo para a detecção da viabilidade celular por uso das sondas fluorescentes SYBR-14 e iodeto de propídio (IP) é uma adaptação dos métodos descritos por Maria et al. (2010) e Zhang et al. (2013). Para tanto utiliza-se um kit comercial (Live/Dead® Sperm Viability Kit; Molecular Probes®, Eugene, EUA). Esse kit é constituído por duas sondas fluorescentes que se ligam às cadeias de DNA de acordo com a integridade da membrana celular do parasito. O iodeto de propídio (IP) é uma sonda que não consegue atravessar uma membrana plasmática saudável, sendo capaz de penetrar apenas em membranas lesadas e se ligar à cadeia de DNA, marcando as células consideradas mortas ou inviáveis. O SYBR-14 é uma sonda anfipática que passa através da membrana intacta ou saudável. Ao entrar na célula, há uma perda do grupo acil do SYBR-14 por meio da ação de esterases intracelulares, o que resulta na sua ligação com o DNA, tornando-a fluorescente. Quando ligados ao DNA, a máxima emissão de fluorescência do SYBR-14 e iodeto de propídio são 516 nm e 617 nm, respectivamente. Existem filtros específicos nos microscópios de epifluorescência que permitem a visualização simultânea das células coradas com as duas sondas, dependendo da amplitude do espectro do filtro utilizado.

Ensaio prévios foram realizados para ajustar as concentrações dos fluorocromos para as condições mais favoráveis de visualização.

Metodologia

Considerações gerais

Para a realização da análise de viabilidade dos parasitos, inicialmente é necessário o preparo das soluções de trabalho das sondas.

A solução estoque de SYBR-14 é adquirida comercialmente na concentração de 1 mM diluída em dimetilsulfóxido (DMSO), já o iodeto de propídio na concentração 2,4 mM diluído em água. Para

preparo da solução de trabalho de SYBR-14, inicialmente sua solução estoque deve ser diluída 50 vezes em DMSO (concentração final: 20 μ M). O iodeto de propídio, por outro lado, já vem na concentração ideal para uso.

As soluções podem ser armazenadas a -20°C e reutilizadas, sempre protegidas do contato direto com a luz, pois as sondas podem ser excitadas com comprimento de onda na faixa da luz visível.

Protocolo para avaliação da viabilidade do *Ichthyophthirius multifiliis*

A metodologia pode ser utilizada para qualquer fase do parasito em estágio móvel de trofante a terontes e inclusive em estágio imóvel de tomonite e deve ser realizada a temperatura ambiente (~ 25°C).

Os estágios móveis (trofante e teronte) e imóveis (tomontes e tomitos) devem ser distribuídos em uma placa de Kline ou em lâminas com escavações, contendo 200 μ L de água destilada em cada poço. Em experimentos prévios utilizamos 15 parasitos por poço. Os parasitos devem ser coletados com auxílio de micropipeta adaptando-se o volume na quantidade desejada para o poço.

Em cada poço deve ser adicionado 2,5 μ L de solução de trabalho de SYBR-14 (concentração final 250 nM) e a mistura incubada durante 5 minutos. Posteriormente, devem ser adicionados mais 2,5 μ L de iodeto de propídio (IP) (concentração final 30 μ M), incubando-se a mistura por mais 5 minutos.

A avaliação da viabilidade deve ser realizada até 20 minutos após a incubação com as sondas, por meio de microscópio de epifluorescência. Após esse período, já é possível observar alterações na emissão de fluorescência pelos parasitos, podendo resultar em erros de avaliação. Os parasitos que emitirem fluorescência verde devem ser considerados viáveis ou com membrana plasmática íntegra, e os que emitirem fluorescência vermelha, considerados mortos ou com membrana plasmática lesada. Nas avaliações é possível observar também um terceiro grupo de parasitos que se caracteriza por apresentar células coradas de verde e vermelho simultaneamente, o que pode indicar início do processo de morte celular quando adicionados às sondas. Este grupo de parasitos pode ser incluído na categoria de mortos.

Para facilitar a visualização dos estágios móveis, pode ser adicionado 4 μ L de uma solução de glutaraldeído 0,2%, após a incubação com as sondas fluorescentes. A presença desse fixador promoverá a imobilidade dos parasitos para facilitar a visualização. Nesse caso, ressalta-se que a visualização deve ser imediata, pois após 10 minutos de exposição ao glutaraldeído, a integridade da membrana é afetada. Assim, ao se utilizar o fixador, o tempo de observação é reduzido, exigindo-se que haja um planejamento cuidadoso quanto ao tempo de execução dos procedimentos de eficácia e avaliação de viabilidade.

Protocolo para avaliação da viabilidade de monogenéticos

Para os parasitos monogenéticos o procedimento é semelhante porém, caso os ensaios de eficácia tenham sido realizados com o arco braquial, os monogenéticos precisaram ser retirados ainda aderidos ao filamento branquial ou coletados caso estiverem soltos. Esses filamentos e parasitos isolados são então transferidos para a placa de Kline ou lâminas com poços, realizando o mesmo procedimento descrito acima, porém utilizando-se uma densidade mais baixa de monogenético por placa (n = 5). Ressalta-se que o uso do filamento braquial no processo pode dificultar a observação clara da fluorescência, sendo então sugerido quando possível o isolamento do parasito para uso da técnica.

Análise e interpretação dos dados

Na Figura 1, observa-se a representação da mortalidade de trofontes e tomontes, demonstrando claramente a diferença observada entre os parasitos não viáveis com fluorescência vermelha que internalizaram a sonda IP, e o parasito viável com coloração verde emitida pelo SYBR-14. Além dos estágios fluorescentes vermelhos e verdes, também podem ocorrer fases mistas em que o protozoário emite fluorescência verde e fluorescência vermelha, simultaneamente. Alguns autores relatam que esse parasito já possui sua membrana lesada e está em processo apoptótico com comprometimento da sua sobrevivência. Como a membrana celular neste caso já foi danificada, antes ou durante a coloração, eles são tratados como mortos.

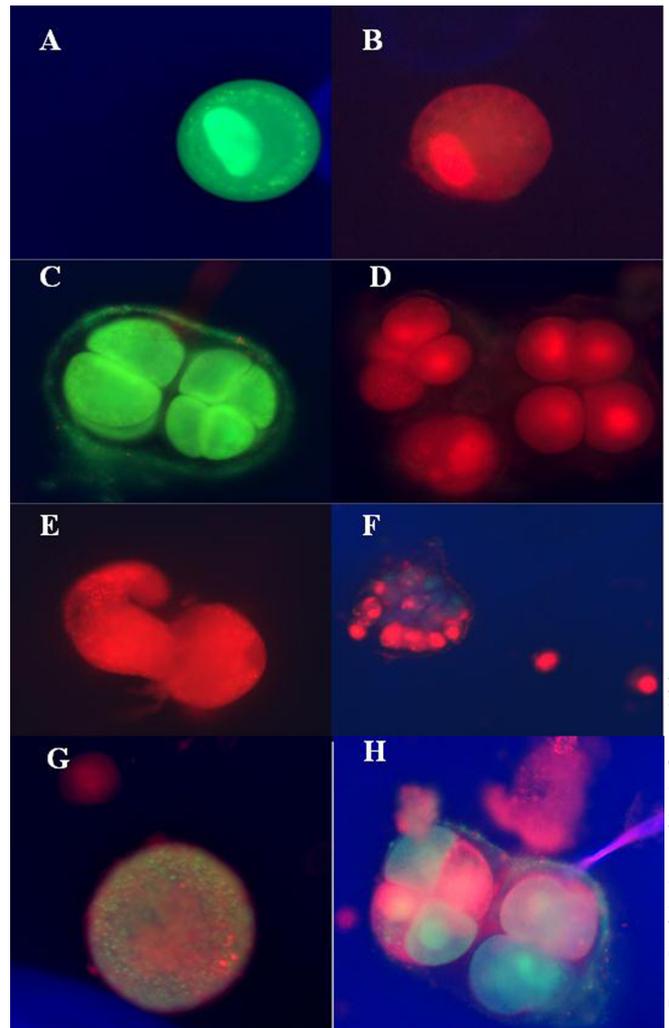


Foto: Daniela Aparecida de Castro Nizio

Figura 1. *Ichthyophthirius multifiliis* após coloração com as sondas fluorescentes SYBR- 14 e iodeto de propídio (IP). A e C) Trofontes e tomonte emitindo fluorescência verde indicando a viabilidade dos parasitos. B e D) Trofontes e tomonte emitindo fluorescência vermelha indicando comprometimento da membrana celular. E) Extravasamento do citoplasma de um trofante. F) Tomitos em um tomonte. G e H) Trofante e tomonte, respectivamente, emitindo fluorescência vermelha e verde, uma resposta que indica que o protozoário estava no processo de morte (apoptose), quando foram adicionadas as sondas. Aumento de 100X: fotos A-E, G e H. Aumento de 40X: foto F.

Na Figura 2, observa-se a viabilidade de monogenéticos de tambaqui (*Colossoma macropomum*).

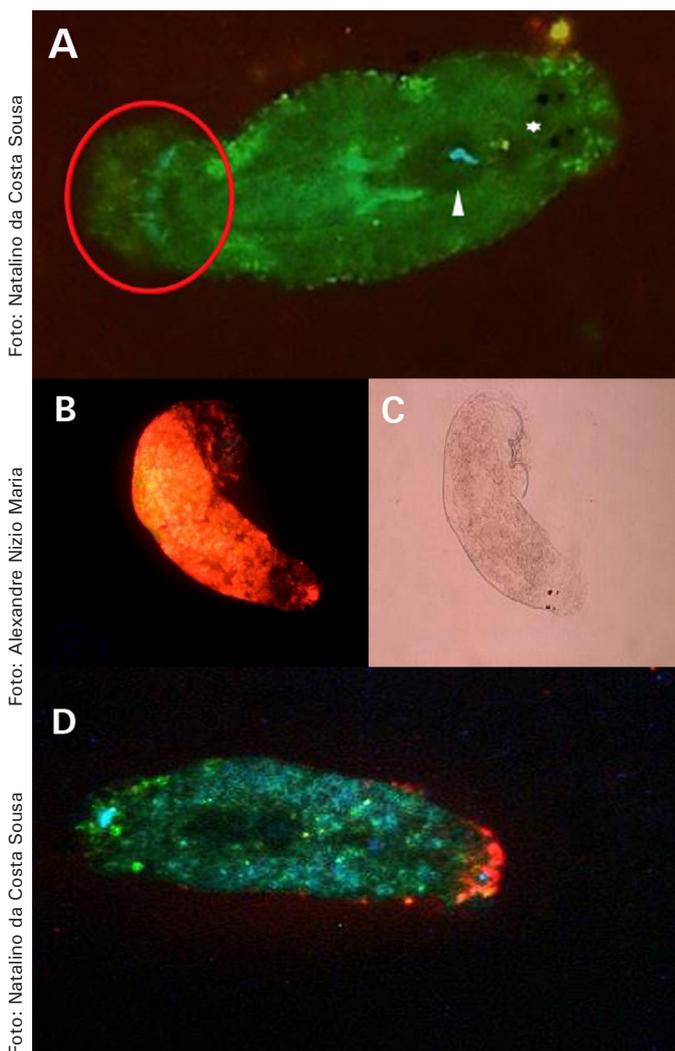


Figura 2. Monogenéticos de tambaqui após coloração com as sondas fluorescentes SYBR-14 e iodeto de propídio (IP). A) Parasito emitindo fluorescência verde indicando a sua viabilidade. Detalhes: Ocelos (★), cirrus (▲) e haptor (○); B) Parasito emitindo fluorescência vermelha indicando comprometimento das células; C) Mesmo parasito da Figura B, visualizado em microscopia de luz; D) Monogenético emitindo fluorescência vermelha e verde, demonstrando o início do comprometimento da membrana celular. Aumento de 100X.

Na Figura 3, observa-se o resumo do protocolo de análise.

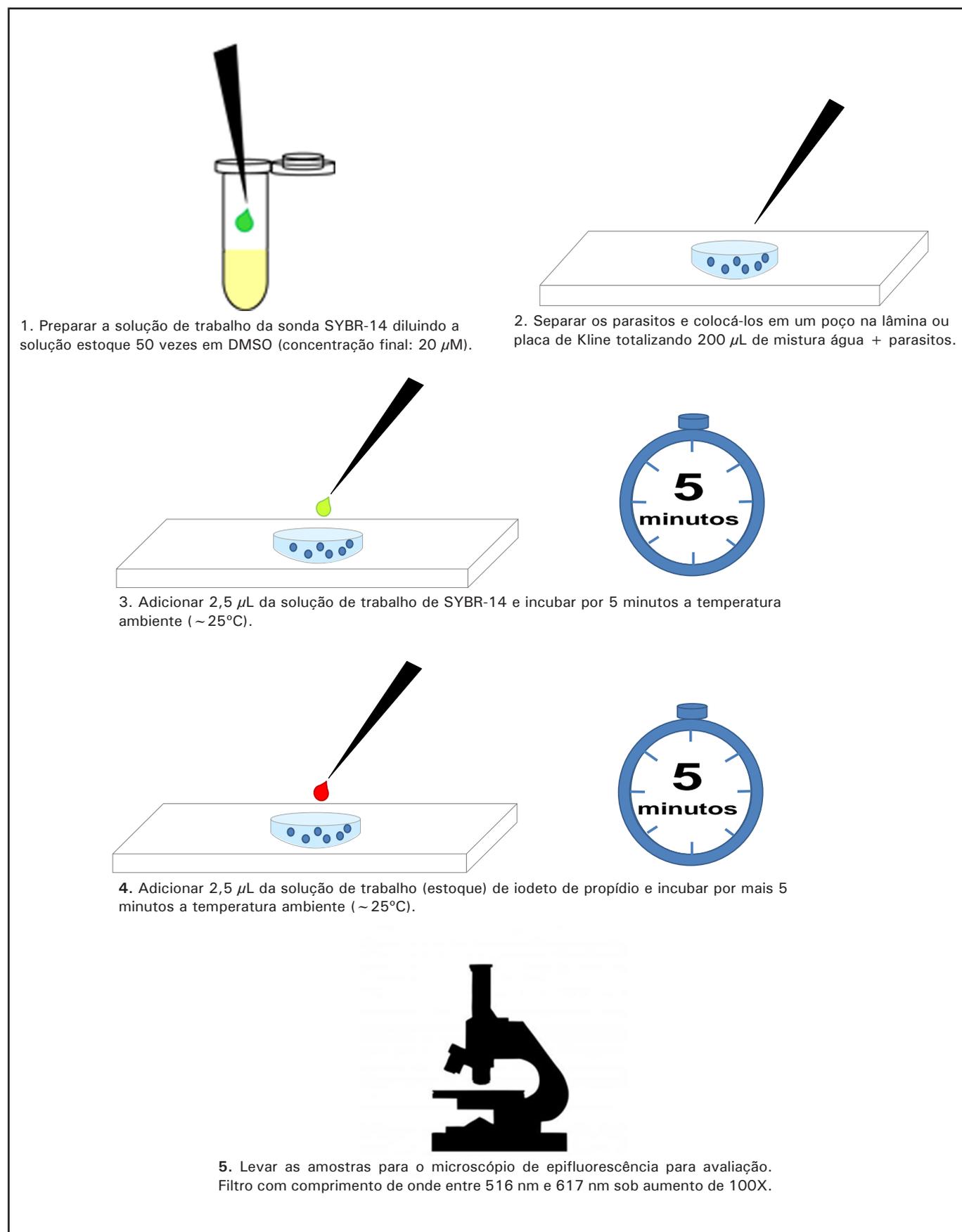


Figura 3. Resumo do protocolo de análise.

Considerações finais

A utilização de sondas fluorescentes SYBR-14 e iodeto de propídio (IP) de forma combinada se apresentam como uma alternativa de fácil aplicação, rápida e precisa para análise de viabilidade de parasitos como em estudos de eficácia de produtos químicos no controle de parasitos de peixes, sendo complementar à análise de imobilidade que tem sido utilizada para prever a mortalidade destes patógenos.

Referências

- MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P.; SILVA, C. A.; CARNEIRO, P. C. F. Semen characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, n. 26, p. 779-783, 2010.
- ZHANG, Q.; XU, D. H.; KLESIUS, P. H. Evaluation of an antiparasitic compound extracted from *Gallachinensis* against fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. **Veterinary Parasitology**, St. Lucia, n. 198, p. 45-53, 2013.

Comunicado Técnico, 170

Embrapa Tabuleiros Costeiros
Endereço: Avenida Beira Mar, 3250,
CEP 49025-040, Aracaju - SE.
Fone: (79) 4009-1344
Fax: (79) 4009-1399
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Publicação disponibilizada on-line no formato PDF

1ª edição
On-line (2015)

Comitê de publicações

Presidente: Marcelo Ferreira Fernandes
Secretária-executiva: Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues
Membros: Ana Veruska Cruz da Silva Muniz, Carlos Alberto da Silva, Élio César Guzzo, Hymerson Costa Azevedo, João Gomes da Costa, Josué Francisco da Silva Junior, Julio Roberto Araujo de Amorim, Viviane Talamini e Walane Maria Pereira de Mello Ivo

Expediente

Supervisora editorial: Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues
Tratamento das ilustrações: Joyce Feitoza Bastos
Editoração eletrônica: Joyce Feitoza Bastos