



ENEPEX

ENCONTRO DE ENSINO,
PESQUISA E EXTENSÃO

8° ENEPE UFGD • 5° EPEX UEMS

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *BRANCHIURA sp* EM PEIXES DE CRIAÇÃO

Romário Oliveira de Sales¹; Maisa Estopa Correa²; Mariana Neri Lucas Kurihara³; Peceu Magyve Ragagnin de Oliveira³; Juliana Rosa Carrijo⁴; Simone Simionatto⁵

UFGD-FCBA, C. Postal 533, 79804-970 Dourados-MS, E-mail: romariosalles_pva@hotmail.com; simonesimionatto@ufgd.edu.br

¹ Bolsista de Iniciação Científica da UFGD. ² Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFGD. ³ Acadêmicos do curso de Biotecnologia e integrantes do projeto de pesquisa. ⁴ Co-orientadora, Professora FCBA/UFGD. ⁵ Orientadora, Professora FCBA/UFGD.

RESUMO

A piscicultura é o setor da agropecuária brasileira com maior expansão, com crescimento superior a média mundial. Essa atividade é apontada como um mercado estratégico para o desenvolvimento sustentável, produção de alimentos saudáveis e ampliação de fronteiras inexploradas no país. Apesar da importância da piscicultura, os aspectos sanitários da produção e a falta de estrutura para o diagnóstico das principais enfermidades infecciosas são considerados de grande relevância para o aumento da produção e da produtividade dos plantéis. Este trabalho teve como objetivo identificar parasitas frequentemente encontrados em peixes através do uso de técnicas moleculares, buscando contribuir na melhoria das condições sanitárias da piscicultura do estado de Mato Grosso do Sul. Os parasitas foram obtidos de uma unidade produtora de alevinos de surubim híbrido da empresa Mar & Terra, localizada no município de Bandeirantes, estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Com as análises de bioinformática foi possível selecionar sequências conservadas do parasita *Branchiura sp*, seguido de um alinhamento global e desenho de *primers* específicos. O DNA genômico dos parasitas foi extraído com auxílio de kit comercial e o DNA extraído foi submetido à amplificação do DNA ribossomal do parasita. O DNA ribossomal amplificado foi submetido à purificação e encaminhado para sequenciamento para confirmar a espécie dos parasitas identificados. Além disso, o resultado do sequenciamento

possibilitará a realização de estudos de filogenia, buscando determinar similaridade genética entre as espécies já estudadas.

Palavras-chave: Piscicultura, Parasita, PCR.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo país da América do Sul com maior produção de peixes, precedido apenas pelo Chile (BUSCHMANN, A.H et al., 2012), o qual favorecido pelo clima predominantemente tropical, associado à ampla extensão da área litorânea, de cerca de 8.500 km e abundância de água doce disponível. Estima-se que existam, no país, cerca de 2.587 espécies de peixes de água doce (BUCKUP, P.A et al., 2007), as quais são de fundamental importância para o mercado consumidor crescente, em virtude de mudanças no hábito nutricional (QUESADA, S.P et al., 2013). No estado de Mato Grosso do Sul uma das perspectivas de expansão da agropecuária é a cadeia produtiva da piscicultura (CREPALDI et al., 2006).

Um desafio para o sucesso do cultivo de peixes depende, principalmente, da condição sanitária, em virtude do abundante uso de pesticidas para controlar as parasitoses, que são as principais causas de perdas econômicas em peixes de criação (GUIMARÃES, A.T.B et al., 2007). Dentre os parasitas encontrados destacam-se os crustáceos da subclasse *Branchiura sp* do gênero *Dollops*, os quais podem parasitar várias espécies de peixes silvestres e cultivados, aderido-se na superfície corporal, como nas brânquias e nadadeiras, e consequentemente debilitando o hospedeiro (EIRAS, 1994; PAVANELLI et al., 2002).

A identificação de parasitas é realizada por microscopia óptica em exames realizados a fresco, entretanto essa técnica não permite identificar a espécie (CARVALHO, 2008). As técnicas de biologia molecular têm sido muito utilizadas para o diagnóstico das principais doenças bacterianas e virais. Porém, ainda são escassos os estudos de identificação e caracterização molecular de parasitas de peixes. Este trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar através de técnicas moleculares os parasitas isolados de peixes de criação, buscando traçar o perfil sanitário das criações de peixes do estado do Mato Grosso do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos parasitas

Os parasitas foram obtidos de uma unidade produtora de alevinos de surubim híbrido da empresa Mar & Terra, localizada no município de Bandeirantes, estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Os parasitas foram identificados através da retirada dos arcos branquiais dos

peixes que macroscopicamente apresentaram lesões indicativas da infestação e/ou positivos na microscopia óptica realizada *in loco*. Os arcos branquiais foram cuidadosamente removidos, separados e acondicionados em álcool 70%. As lâminas que apresentaram resultado positivo para a presença dos parasitas foram submetidas à caracterização molecular.

Desenho dos Primers

Com base em informações depositadas no GenBank, foram selecionadas sequências específicas do RNA ribossomal (rRNA) 18S dos *Branchiura sp.* Para identificar regiões conservadas da espécie, as sequências foram submetidas ao alinhamento global no programa ClustalX, com o auxílio do programa Vector NTI®11.0 (Invitrogen), foram desenhados *primers* específicos para a região rDNA, tendo como base as regiões conservadas identificadas no alinhamento.

A tabela 1 demonstra as sequências dos *primers* utilizados neste estudo.

Tabela 1 - Primers específicos utilizados para amplificar a região 18S rRNA dos *Branchiura sp.*

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
18S rRNA <i>forward</i>	5' TGCCAAGGTTTTTACGGGT 3'
18S rRNA <i>reverse</i>	5' CCGCAGGCTCCACCC 3'

Extração de DNA genômico

O DNA genômico dos parasitas foi extraído com auxílio do kit *DNeasy Blood & Tissue* (QIAGEN, Crawley, United Kingdom), conforme instruções do fabricante. A pureza e quantidade de DNA foi verificado em gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience).

Amplificação do rDNA através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA genômico extraído foi submetido à amplificação por PCR, com um volume final de reação de 50 µL, contendo 2 U de DNA Taq polimerase (Sigma), 50 pmol de cada *primer*, 200 µM de cada dNTP, 1 × tampão de reação, 1,5 mM MgCl₂ e 10-50 ng de DNA.

As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf) nas seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial a 95°C por 5 min., seguida de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 min., anelamento 52°C por 1 min.,

e extensão a 72°C por 1 min, e extensão final a 72°C por 7 min. Posteriormente os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience).

Sequenciamento de DNA

O produto amplificado na PCR foi submetido a purificação de DNA com o kit *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE-Healthcare) e quantificado por densidade óptica no espectrofotômetro digital NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare, Canadá). As reações de sequenciamento foram preparadas com o BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA), com auxílio do equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Perkin Elmer, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração de DNA genômico utilizando o kit de extração *DNeasy Blood & Tissue* (QIAGEN) possibilitou a obtenção de DNA dos parasitas com concentração e pureza satisfatórias, conforme pode ser observado na figura 1.

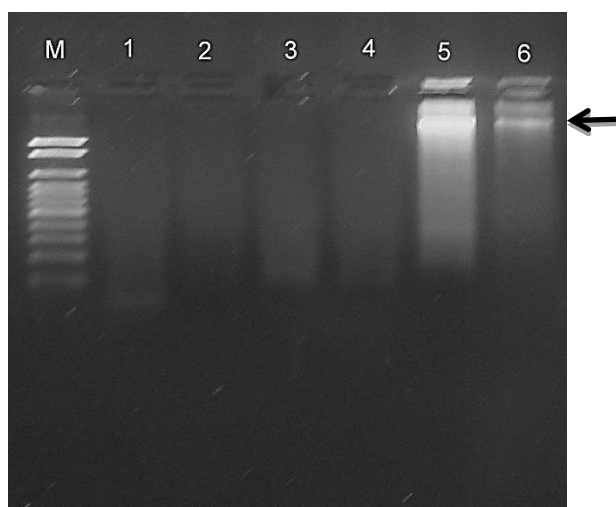


Figura 1.- Resultado da eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience) do DNA genômico de parasitas extraído com Kit *DNeasy Blood & Tissue* (QIAGEN). Coluna M: marcador de peso molecular *Ladder* 100 pb (Sigma); Colunas 1, 2, 3 e 4: controles negativos da extração de DNA; Coluna 5: extração de DNA genômico do parasita amostra 1; Coluna 6: extração de DNA genômico do parasita amostra 2. A seta indica o DNA genômico extraído.

A padronização da técnica de PCR para amplificação do DNA ribossomal do parasita *Branchiura sp* foi realizada testando várias temperaturas e condições de ciclagem, sendo que na temperatura de anelamento a 52°C apresentou uma melhor concentração de produto amplificado, conforme pode ser observado na figura 2.

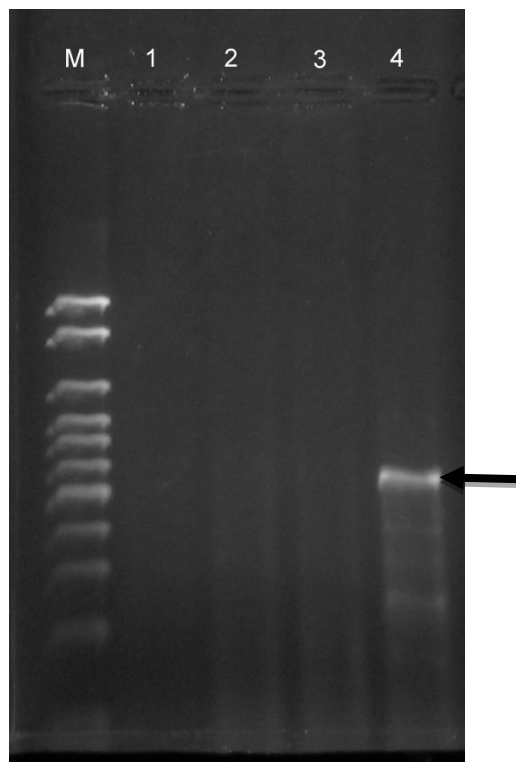


Figura 2.—Resultado da eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience) do produto amplificado na PCR de *Branchiura sp*, submetido a um gradiente de temperatura. Coluna M: marcador de peso molecular *Ladder* 100 pb (Sigma); Coluna 1: controle negativo da PCR; Coluna 2: PCR com temperatura de anelamento a 66°C; Coluna3: PCR com temperatura de anelamento a 53°C; Colunas 4: PCR com temperatura de anelamento a 52°C. A seta indica o produto amplificado pelo PCR na altura de 600 pb.

O produto amplificado na PCR foi submetido ao sequenciamento de DNA e as sequências obtidas foram analisadas usando o *Laser gene Software Package* (DNASTAR, Madison, USA). Porém, as sequências obtidas apresentaram duplicidade de nucleotídeos, provavelmente indicando a presença de sequências diferentes na amostra. Por conta disso, optou-se por realizar a clonagem deste material em vetores plasmidiais com intuito de comprovar a identidade destas sequências. Esta etapa será realizada no projeto.

CONCLUSÃO

A caracterização molecular de *Branchiura sp* é uma etapa importante na busca de alternativas de tratamento e/ou profilaxia de uma importante parasitose de peixes, reduzindo com isso a alta taxa de morbidade e mortalidade na fase inicial de criação. Além disso, o diagnóstico molecular garante maior qualidade da carne de peixe, inserção e credibilidade no mercado.

AGRADECIMENTOS

A UFGD pela bolsa concedida e ao CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

BUCKUP, P.A.; MENEZES, N.A. & GHAZZI, M.S. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Ed. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007.

BUSCHMANN, A.H.; TOMOVA, A.; LOPEZ, A.; MALDONADO, M.A., HENRIQUEZ, L.A., et al. Salmon Aquaculture and Antimicrobial Resistance in the Marine Environment. PLoS ONE vol. 7, n. 8, 2012.

CARVALHO, D. C. Identificação molecular de peixes: o caso do Surubim (*Pseudoplatystoma* spp.). Em: Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.32, n.4, p. 215-219. Outubro/Dezembro, 2008.

CREPALDI, D. V.; FARIA, P. M.C.; TEIXEIRA, E. DE A.; RIBEIRO, L. P.; COSTA, A.A.P.; MELO, D. C. DE; CINTRA, A. P. R.; PRADO, S. DE A.; COSTA, F. A. A.; DRUMOND, M. L.; LOPES, V. E.; MORAES, V. E. O surubim na aquacultura do Brasil. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.30, n.3/4, p.150-158, Julho./Dezembro, 2006.

EIRAS, J.C. Elementos de ictioparasitologia. Porto, Portugal: Fundação Eng. Antônio de Almeida, p. 339, 1994.

GUIMARÃES, A.T.B.; SILVA DE ASSIS, H.C.; BOEGER, W. The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. Ecotoxicol. Environ. Saf. n. 68, p. 57–62, 2007.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKAMOTO, R. M. Doenças de peixes: Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento. Maringa: Eduem, p. 305, 2002.

QUESADA, S.P.; PASCHOAL, J.A.R.; REYES, F.G.R. Considerations on the Aquaculture Development and on the Use of Veterinary Drugs: Special Issue for Fluoroquinolones - A Review. Journal of Food Science, vol. 78, n. 9, 2013.