



Implementação do teste com embriões do peixe *Danio rerio* no Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (LAEG) da Faculdade de Tecnologia – UNICAMP.

Marcella Cavalcanti Seraphim*, Gisela A. Umbuzeiro ◦, Rhaul Oliveira ▪
marcellacseraphim@gmail.com*, giselau@ft.unicamp.br ◦, rhaul.oliveira@gmail.com ▪
Faculdade de Tecnologia, UNICAMP, Rua Paschoal Marmo, 1888, 13484-332 Limeira, SP, Brasil

1. Introdução

O objetivo do presente projeto foi desenvolver, implementar e padronizar o cultivo do organismo *Danio rerio*, popularmente conhecido como peixe-zebra, no Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (LAEG) da Faculdade de Tecnologia – UNICAMP.

O peixe-zebra é um pequeno teleosteo (3-4cm) de água doce da família Cyprinidae, originário do Sudoeste da Ásia (Engeszer et al., 2007). A espécie vem sendo empregada mundialmente em estudos de ecotoxicologia devido a características como representatividade em relação ao grupo de peixes, facilidade de manutenção em laboratório e estabilidade genética. Atualmente, os peixes adultos estão sendo substituídos por embriões em testes ecotoxicológicos por apresentarem rápido desenvolvimento embrionário (em 96h vários de seus órgãos estão formados), grande quantidade de embriões produzida e pequeno tamanho (Moura e Oliveira, 2014). Os embriões também são transparentes e os órgãos do peixe-zebra desenvolvem rapidamente sendo um ótimo sistema miniaturizado para testes com sistemas biológicos *in vivo* (Dammski et al., 2011).

O Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (LAEG) desenvolve atividades de ensino e pesquisa envolvendo avaliação de riscos ecotoxicológicos de substâncias químicas incluindo corantes, metais, nanomateriais, agrotóxicos, e desenvolvendo novos protocolos de testes de toxicidade aguda e crônica com organismos aquáticos (Salgueiro, 2012). O LAEG conta com o cultivo de diversos organismos, bactérias, invertebrados e algas, para avaliação de toxicidade, mas anteriormente a este projeto não contava com o cultivo de peixes, um dos organismos exigidos para avaliação de risco de substâncias químicas. O cultivo de *D. rerio* é essencial para complementar a bateria de ensaios ecotoxicológicos realizados pelo laboratório.

Para realização de ensaios com embriões de peixes são necessários lotes numerosos de organismos, uniformes e com histórico de informação conhecidos. Por isso, fez-se necessária a implementação do Biotério de Cultivo de Peixe-zebra e a sua padronização, com a vigência de um sistema de qualidade, estabelecimento e monitoramento de parâmetros de qualidade de cultivo e desenvolvimento de técnicas para a criação e reprodução desses animais. Portanto, o biotério tem como objetivos oferecer embriões de peixe-zebra para ensaios ecotoxicológicos realizados pelo LAEG e colaboradores e oferecer organismos para atividades de ensino, como material complementar para disciplinas oferecidas na Faculdade de Tecnologia.



Figura 1: Peixe-zebra fêmea (à direita) e peixe-zebra macho (à esquerda). A diferenciação pode ser observada pelo abdômen mais saliente da fêmea (principalmente na fase de maturação sexual), enquanto o macho possui um corpo mais delgado. Foto: NC State University



2. Implementação do Biotério

O Biotério de Cultivo de Peixe-zebra do Laboratório de Ecotoxicologia Genotoxicidade de Universidade Estadual de Campinas foi fundado no dia 03 de maio de 2019. Está localizado na Faculdade de Tecnologia FT/UNICAMP, Campus Limeira. A coordenação do biotério está sob a responsabilidade da professora Gisela de Aragão Umbuzeiro e a responsável técnica Ádria Caloto de Oliveira.

A implementação do biotério teve início com as instalações físicas, processo acompanhado pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp, sob a supervisão da veterinária responsável designada pela Pró-Reitoria de Pesquisa da UNICAMP. Para trabalhar com o *D. rerio*, foi necessária a realização de um curso da CEUA/Unicamp sobre legislação e procedimentos para utilização de animais em laboratório e a submissão do projeto de iniciação científica para a Comissão de Ética, que exige um formulário detalhado sobre as justificativas, objetivos e procedimentos que serão realizados em laboratório. Assim, as atividades do projeto foram iniciadas após a aprovação do protocolo. É importante ressaltar que as visitas técnicas da veterinária responsável ainda ocorrem periodicamente e todo o cultivo destes animais estão de acordo com as normas da CEUA/Unicamp.

3. Atual estrutura

Atualmente, o biotério possui capacidade para 1125 peixes adultos, os quais podem ser distribuídos em 5 aquários de 45 litros cada (com separação entre os sexos), conectados entre si por um sistema recirculante de água. A densidade populacional dos aquários é de até 5 peixes por litro.

Todos os procedimentos realizados no biotério estão implementados dentro do Sistema de Gestão de Qualidade do LAEG que atende os requisitos da norma ABNT ISO/IEC 17025, que dispõe de planilhas para organização de materiais e reagentes, controle do cultivo e testes toxicológicos.

O biotério é composto por quatro salas:

1. Sala de Microscopia: onde os testes são lidos e observados. Também é onde está a incubadora dos embriões, capela para realização de determinados experimentos e refrigerador, onde estão armazenadas a ração dos peixes, soluções utilizadas no cultivo e organismos mortos.
2. Sala do Cometa: onde são realizados os testes de cometa, que utilizam o DNA das larvas de peixe-zebra para observar alterações genéticas decorrentes dos testes de exposição.
3. Sala de Lavagem: onde o material utilizado no cultivo do peixe-zebra é lavado, secado e armazenado. Esta sala também possui uma autoclave para esterilizar materiais e um sistema de osmose reversa para produção de água deionizada.
4. Sala de Cultivo: onde estão os aquários de peixe-zebra e todo o sistema automatizado de recirculação de água, além de equipamentos como o timer analógico que controla o fotoperíodo, dois termohigrômetros que medem a temperatura e a umidade do ambiente e um ar condicionado, que regula a temperatura e umidade do local.

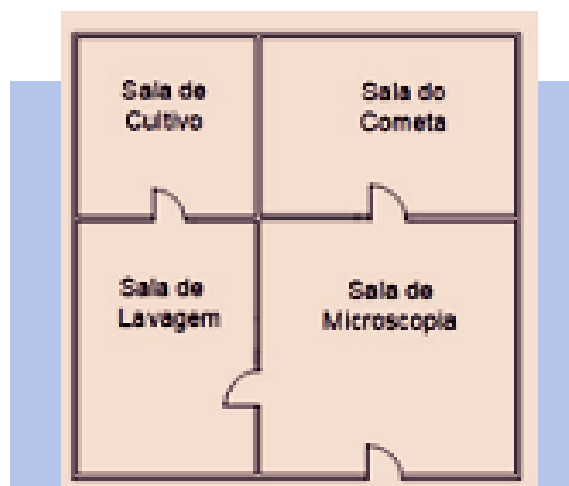


Figura 1: Mapa do Biotério de peixe-zebra.



4. Guia de cultivo

Os resultados deste projeto são a implementação do biotério e o desenvolvimento e padronização das técnicas de cultivo, todos descritos detalhadamente no Guia de Procedimentos do Biotério de Cultivo de Peixe-Zebra no Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (LAEG) FT/UNICAMP, que além de ser utilizado como guia dentro do LAEG pode também ser utilizado como referência para outros biotérios de peixe-zebra.

O desenvolvimento destas técnicas foi baseado na literatura, na experiência dos coordenadores e técnicos do LAEG e na experimentação, por meio da observação da resposta comportamental dos peixes e parâmetros de qualidade da água em relação aos procedimentos adotados. Um meio eficiente de avaliar a saúde dos peixes é a sua reprodução, mediante a quantidade de ovos obtida e à qualidade destes. Abaixo, segue uma versão compacta de alguns tópicos essenciais para o sucesso do cultivo.

4.1 Parâmetros de Qualidade

4.1.1 Parâmetros de Qualidade da Sala de Cultivo

A sala de cultivo deve ter alguns parâmetros monitorados e mantidos em condições ideais, são eles: temperatura, umidade, intensidade luminosa e fotoperíodo. Para medição de temperatura e umidade usam-se termohigrômetros, para controle da temperatura é utilizado ar condicionado, mantido em 23°C e para controle do fotoperíodo utiliza-se timer analógico. Os valores ideais destes parâmetros estão descritos na tabela 1:

Tabela 1: Parâmetros físicos ideais para sala de cultivo.

| Parâmetros | Condições |
|----------------------|--------------|
| Temperatura | 26±1°C |
| Umidade | 40-70% |
| Intensidade Luminosa | 540-1080 lux |
| Fotoperíodo* | 12h/12h |

Adaptado de: "The Laboratory Zebrafish".

*O fotoperíodo deve estar ajustado para período de luz das 8h às 20h.

4.1.2 Parâmetros de Qualidade da Água de Cultivo

Os parâmetros de qualidade da água de cultivo do peixe-zebra observados são: condutividade, pH, oxigênio dissolvido, dureza, temperatura, amônia, nitrito e nitrato. A água de cultivo do peixe-zebra é formada por água de osmose reversa reconstituída com sal marinho e solução de bicarbonato de sódio com carbonato de cálcio, responsáveis pelo controle da condutividade e pH da água. Diariamente (exceto aos finais de semana), faz-se a medição da condutividade, pH, oxigênio dissolvido, dureza e temperatura dos aquários.

Tabela 2: Parâmetros recomendados para a água de cultivo a serem medidos diariamente.

| Parâmetros | Condições |
|--------------------------|-------------------------------|
| Condutividade | 750 ± 50 µS/s |
| pH | 7,5 ± 0,5 |
| Oxigênio Dissolvido | > 6,0 mg/L |
| Dureza | 30 a 300 mg/CaCO ₃ |
| Temperatura dos Aquários | 24 - 28°C |

Adaptado de: "The Laboratory Zebrafish".



Semanalmente, às sextas-feiras, mede-se o valor dos compostos nitrogenados.

Tabela 3: Parâmetros recomendados de qualidade da água de cultivo a serem medidos semanalmente.

| Parâmetros | Condições |
|------------|---------------------|
| Amônia | < 1 $\mu\text{g/L}$ |
| Nitrito | < 1 $\mu\text{g/L}$ |
| Nitrato | < 48 mg/L |

Adaptado de: “The Laboratory Zebrafish”.

4.2 Sistema de Recirculação de Água

O sistema dos aquários trabalha com recirculação de água contínua, sendo que diariamente são trocados manualmente 30 litros de água, o que representa um pouco mais de 10% do volume total dos aquários. A água utilizada provém de osmose reversa e é estocada em um reservatório onde se adiciona sal marinho e solução de bicarbonato de sódio e carbonato de cálcio até que se atinja os valores ideais de condutividade e pH.

O sistema de tratamento de água é composto por filtragem mecânica, em que a água advinda dos aquários passa por um encanamento de recolhimento e em seguida passa pela manta de lã acrílica (perlon); filtragem biológica, composta por tubos de cerâmica que possuem poros onde crescem colônias de bactérias nitrificantes; e desinfecção por lâmpada UV, responsável pela eliminação de micro-organismos.

A limpeza é feita em três períodos: semanalmente faz-se a remoção de sujidades acumuladas no vidro dos aquários com o auxílio de uma esponja; quinzenalmente realiza-se a lavagem do perlon (filtro mecânico); e mensalmente faz-se a limpeza completa do sistema recirculante.

4.3 Alimentação

A nutrição dos peixes no Biotério de Cultivo de Peixe Zebra é feita por ração comercial para peixes de pesquisa científica de alta qualidade, oferecida uma vez ao dia, na parte da manhã, em dosagens correspondentes a aproximadamente 3% do peso total dos peixes de cada compartimento do aquário, sendo que cada dosagem está previamente pesada e acondicionada em um tubo tipo eppendorf de 1,5 mL. Os eppendorfs com as rações são armazenados em refrigerador.



4.4 Reprodução

No Biotério de Cultivo de Peixe-zebra, os peixes são colocados para cruzamento semanalmente, variando-se os indivíduos de acordo com o aquário. Isso é feito para que eles se acostumem com a técnica de reprodução.

Deste modo, para reprodução usam-se aquários especiais nos quais os peixes são colocados e divididos entre machos e fêmeas (proporção de 2 machos para 1 fêmea) por uma divisória que permite o compartilhamento da mesma água, importante para liberação de feromônios que estimulam o acasalamento. O meio utilizado é a água de cultivo do reservatório, com os parâmetros de qualidade da água ajustados. O fundo do aquário é preenchido por três camadas de bolas de gude para que os ovos liberados caiam entre elas, evitando assim que os peixes comam estes ovos (comportamento comum na espécie). Também é colocado um termostato ajustado à 28°C, pois os peixes reproduzem melhor em temperaturas mais altas. Assim, uma hora antes do fotoperíodo de luz, retira-se a divisória e inicia-se o ritual de acasalamento.

Após uma hora, recolhe-se os embriões por meio do despejo da água em uma peneira com poros de 600 μm de diâmetro. Posteriormente, é feita a limpeza dos ovos (pois eles podem estar acompanhados por resíduos do aquário). Depois de limpos, os ovos são colocados em uma placa de petri e é feita a separação de ovos viáveis e ovos não viáveis. Para testes toxicológicos, os ovos coletados podem ser colocados em placas de petri com a solução de exposição, para que os efeitos sejam observados desde os primeiros estágios de desenvolvimento.

4.5 Eutanásia

O método recomendado para eutanásia depende da idade dos organismos, designada por dpf (dias pós fertilização). Para organismos com mais de 7 dpf, recomenda-se a imersão dos peixes em solução de MS-222, com concentração de 200-300 mg por litro de água deionizada, por aproximadamente 10 minutos até imobilidade do opérculo. Para organismos com 4 a 7 dpf, faz-se exposição a solução de hipoclorito de sódio 6.15% com água. Para embriões com menos de 4 dpf, recomenda-se a eutanásia por congelamento.

Agradecimentos

Agradeço à PIBIC, pela bolsa de pesquisa, ao Professor Rhaul e à Professora Gisela pela orientação e à equipe do LAEG, por todos os ensinamentos e apoio.

Referências

Harper, C.; Lawrence, C. *The Laboratory Zebrafish*. Boca Raton: CRC Press, 2011. Disponível em <<https://doi.org/10.1201/b13588>>. Acesso em: janeiro, 2020.

Dammski, A. P., Müller, B. R., Gaya, C., & Regonato, D. *Zebrafish-Manual de criação em Biotério*. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná, 20-1., 2011.

R. E. Engeszer, L. B. Patterson, A. A. Rao, and D. M. Parichy, "Zebrafish in the Wild: A Review of Natural History and New Notes from the Field," *Zebrafish*, vol. 4, no. 1, 2007.

Wilson, J. M.; Ralph M. B.; Carty, A. J. "Evaluation of Rapid Cooling and Tricaine Methanesulfonate (MS222) as Methods of Euthanasia in Zebrafish (*Danio Rerio*)." *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* : JAALAS 48(6): 785-89, 2009.