UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

JAQUELINE VERCONTI GANDOLFO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *MIXOSPORÍDEOS* ISOLADOS DE PEIXES EM SUA FASE INICIAL DE CRIAÇÃO

Dourados/MS

Dezembro de 2013

JAQUELINE VERCONTI GANDOLFO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *MIXOSPORÍDEOS* ISOLADOS DE PEIXES EM SUA FASE INICIAL DE CRIAÇÃO

Trabalho de Conclusão do Curso de graduação apresentado a Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.
Orientadora: Prof.ª Dr.ª Simone Simionatto.
Co-orientadora: Prof.ª Dr.ª Juliana Rosa Carrijo Mauad.

Dourados/MS

Dezembro de 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da UFGD, Dourados, MS, Brasil

G111c Gandolfo, Jaqueline Verconti.

Caracterização molecular de *Mixosporídeos* isolados de peixes em sua fase inicial de criação / Jaqueline Verconti Gandolfo – Dourados, MS : UFGD, 2013.

32 f.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Simionatto.

Monografia (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Peixes – Criação. I. Simionatto, Simone. II. Título.

CDD: 597

Responsável: Vagner Almeida dos Santos. Bibliotecário - CRB.1/2620

JAQUELINE VERCONTI GANDOLFO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *MIXOSPORÍDEOS* ISOLADOS DE PEIXES EM SUA FASE INICIAL DE CRIAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia na Universidade Federal da Grande Dourados, pela comissão formada por:

_____
Profª Drª Simone Simionatto

_____
Profª Drª Juliana Rosa Carrijo Mauad

_____
Prof. Dr. Fábio Juliano Negrão

Dourados, 19 de Dezembro de 2013.

"A lei da mente é implacável; O que você pensa,
você cria.
O que você sente, você atrai.
O que você acredita, torna-se realidade."
(Buddha)

Dedico este trabalho especialmente a minha família e ao meu namorado, que sempre me apoiaram e me mostraram que o que constrói uma vida plena são os sonhos; sendo assim, graças a eles, junto com este trabalho concluído, mais um sonho se realiza.

AGRADECIMENTOS

A Deus por nunca me abandonar, e me dar a força e determinação de vencer.

Aos meus pais Elson Gandolfo e Sueli Ap. Verconti, que tornaram possível esse sonho e apoiaram todas as minhas decisões, com muito amor fraterno, compreensão e companheirismo, sem eles nada disso seria realizado.

A minha irmã Jhennifer V. Gandolfo pelo amor e companheirismo.

A minha família que sempre esteve comigo nos momentos mais difíceis, me apoiando e me mostrando que os obstáculos eram possíveis de serem vencidos.

Ao meu namorado Pedro Henrique pelo apoio, compreensão e amor concedido, estando presente em todos os momentos e não me deixando desanimar nunca.

A minha orientadora, Prof. Dra. Simone Simionatto pela paciência e tempo concedido, e por ter sido peça fundamental no meu crescimento acadêmico.

Aos meus amigos pela acolhida, companheirismo e ajuda durante a vida acadêmica, principalmente a Ana Taniely P. dos Santos, Isabella C. Dias e Wirlaine G. Maciel.

A Wirlaine G. Maciel e Ronaldo Omizolo pela ajuda e amizade na execução deste projeto.

A Prof. Dra. Juliana R. Carrijo pela disponibilidade de material para realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Fábio Juliano Negrão pelos concelhos e ajuda.

A Universidade Federal da Grande Dourados pelo apoio e infraestrutura disponibilizada.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro e a bolsa concedida.

A todos que de uma forma ou de outra tiveram participação na realização deste projeto.

RESUMO

A aquicultura brasileira tem crescido nos últimos anos devido ao cultivo de peixes de interesse comercial, como o Surubim híbrido, proveniente do cruzamento entre duas espécies, o surubim-cachara ou cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum* ♀) e o surubim-pintado ou pintado (*Pseudoplatystoma corruscans* ♂), conhecido como híbrido fértil. O sucesso da aquicultura depende vários aspectos, dentre eles, os aspectos sanitários como profilaxia, diagnóstico e terapêutica; no entanto, tais práticas de sanidade raramente são adotadas pelos criadores de peixes, devido a crescente demanda, tanto do mercado interno como externo e isso tem favorecido o surgimento de algumas enfermidades parasitárias. As doenças parasitárias são consideradas as principais causas das altas taxas de mortalidade de peixes. Os parasitas frequentemente identificados nestes peixes são os do filo *Myxozoa* (*Mixosporídeos*), dentre eles os gêneros *Henneguya* sp. e *Myxobolus* sp. A identificação dos parasitas presentes nas criações de peixes contribui para criar novas técnicas de manejo visando à melhoria dos indicadores sanitários. A piscicultura do Centro-Oeste é uma das mais importantes do Brasil. No entanto, existem poucos estudos de identificação de parasitas nestas criações. O presente estudo propõe caracterizar através de técnicas moleculares, os parasitas isolados de peixes durante a fase inicial de criação do Estado do Mato Grosso do Sul (MS). Foram avaliadas amostras de Surubim híbrido do MS durante sua fase inicial de criação, primeiramente macro/microscopicamente, sendo que os que se apresentaram positivos, demonstrando lesões císticas da presença dos parasitas, foram encaminhados para análises moleculares através da Reaction Polimerase Chain (Reação em Cadeia da Polimerase – PCR), e através desta técnica sensível de detecção foi possível comprovar a presença e espécie dos parasitas que estavam acometendo as criações de peixes do estado. Este estudo vai ajudar a estabelecer novas técnicas de gestão, contribuindo na redução de doenças parasitárias em criações de peixes e, consequentemente, na redução da mortalidade destes animais.

Palavras-Chaves: Sanidade de peixes; *Henneguya* sp.*;* PCR.

ABSTRACT

Brazilian fish farms have grown in recent years due to the farming of fish of commercial interest, such as hybrid catfish derived from a cross between two species, (*Pseudoplatystoma reticulatum* ♀ and *Pseudoplatystoma corruscans* ♂), known as fertile hybrid. The fish farmers employ inadequate sanitations practices, which favor the emergence of parasitic diseases. These are considered the main causes of the high mortality rates of fish. The parasites frequently identified in these fish are from the *Myxosporean* family, among them *Henneguya* and *Myxobolus* genera. The identification of parasites present in fish farming contributes to the creation of new management techniques aimed at improving health indicators. Fish farming in the Midwest is one of the most important in Brazil. However, there are few studies that identify parasites in these farms. This study aimed to characterize through molecular techniques parasites isolated from farmed fish in Mato Grosso do Sul. This study will help to establish new management techniques, contributing to the reduction of parasitic diseases in fish farms and consequently, the reduction of mortality in these animals.

Keywords: Fish; Health; *Henneguya* sp.; PCR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene 18S rRNA.....12

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa ilustrativo da região de Bandeirantes e da região de Dourados.....10

Figura 2 – a) Coleta de Juvenil de surubim híbrido b) Análise macroscópica da brânquia de Surubim, para identificar a presença ou não de cistos de Mixosporídeos, como indicado pela seta vermelha.....11

Figura 3 - *Henneguya* sp. encontrado em brânquias de surubim híbrido, resultado de *H. corruscans* e *H. pseudoplatystoma* observados em microscopia óptica no exame a fresco e corados com Giemsa.....11

Figura 4 - Resultado da eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience) do DNA genômico extraído de cistos dos parasitas *Henneguya* com quatro protocolos testados.....13

Figura 5 - Resultado da eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience) do DNA genômico extraído de cistos dos parasitas *Henneguya* com kit comercial.....14

Figura 6 - Resultado da eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience) do DNA genômico de *Henneguya* amplificado pela técnica da PCR.....15

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1

2. OBJETIVO 2

2.1. Objetivo Geral 2

2.2. Objetivos Específicos 2

3. HIPÓTESE 2

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 2

5. MATERIAL E MÉTODOS 6

5.1. Obtenção dos Parasitas 6

5.2. Desenho de Oligonucleotídeos iniciadores 7

5.3. Extração e purificação de DNA genômico 7

a) Protocolo utilizando Brometo de Hexadeciltrimetilamônio (CTAB), segundo o descrito por Hallett, et al. 2001 8

b) Protocolo utilizando Partículas de Sílica modificado, baseado no trabalho de Boom, et al. 1990 8

c) Protocolo utilizando Fenol-Clorofórmio modificado, baseado no trabalho de Bardakci e Skibinski, 1994 8

d) Protocolo utilizando Solução de Precipitação Proteica, segundo Crispim, et al. 2010 9

e) Kit de Extração DNeasy Blood & Tissue Kit, (QIAGEN, Crawley, United Kingdom) 9

5.4. Amplificação do rDNA dos *Mixosporídeos* através do método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) 9

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO 10

7. CONCLUSÃO 15

8. PERSPECTIVAS FUTURAS 16

9. REFERÊNCIAS 16

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura no Brasil teve um avanço significativo nos últimos anos, devido ao cultivo de peixes de interesse comercial, como é o caso do surubim híbrido, híbridos férteis provenientes do cruzamento artificial de duas espécies distintas, o surubim-cachara ou cachara (Pseudoplatystoma reticulatum ♀) e o surubim-pintado ou pintado (Pseudoplatystoma corruscans ♂) (Ishikawa *et al.*, 2011). Estes peixes são considerados nobres e agregam grande valor comercial graças às características organolépticas da carne, como pouca presença de espinhos e carne suculenta (Crepaldi *et al.*, 2006). Contudo, devido à forma de cultivo visando apenas à alta produtividade e a produção em larga escala, questões sanitárias passam a ter destaque nestas criações.

As enfermidades parasitárias são frequentes e causam alta mortalidade de peixes e consequentemente, prejuízos econômicos aos produtores. Dentre os parasitas encontrados na criação de peixes estão os *Mixosporídeos*, dentre eles *Henneguya* sp. e *Myxobolus* sp., presentes geralmente nos órgãos internos, brânquias e superfície corporal (Adriano *et al.*, 2002). Estes parasitas quando em desequilíbrio com o hospedeiro podem causar sérios danos, como hemorragias, lesões cutâneas e focos inflamatórios nas brânquias e superfície corporal, os quais ocorrem devido aos fatores intrínsecos da atividade, principalmente de aspectos sanitários como profilaxia, diagnóstico e terapêutica, que na maioria das vezes não são respeitados (Luque, 2004a; Pavanelli *et al.*, 2008).

No Estado do Mato Grosso do Sul ainda são escassos os estudos de identificação dos parasitas presentes nas criações de peixes, especialmente dos gêneros propostos. Atualmente os parasitas são identificados por técnicas morfológicas em exames realizados a fresco através de microscopia óptica e por análises macroscópicas de fragmentos dos diferentes órgãos acometidos, como rim, baço e fígado (Lom e Arthur, 1989). No entanto, estes métodos não conseguem classificar as espécies dos parasitas, devido à alta similaridade que os *Mixosporídeos* partilham, sendo necessário o uso conjunto de técnicas moleculares para auxiliar na identificação dos mesmos (Molnár *et al.*, 2002).

Com base nesta problemática, este trabalho teve como objetivo caracterizar os parasitas isolados de surubins em fase inicial de criações do Estado do Mato Grosso do Sul (MS). Acredita-se que a caracterização molecular dos parasitas, contribuirá com a identificação das espécies que acometem os peixes híbridos do MS, além de servir para traçar medidas

sanitárias e técnicas de manejo mais adequadas, auxiliando assim em melhores rendimentos nesta produção e na economia da região.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Identificação molecular de *Mixosporídeos* isolados de criadouros comerciais de peixes em fase inicial de criação localizados no estado do Mato Grosso do Sul (MS).

2.2. Objetivos Específicos

Extrair o DNA genômico dos *Mixosporídeos*.

Desenhar oligonucleotídeos iniciadores específicos para o DNA ribossomal (rDNA) dos *Mixosporídeos*.

Amplificar o rDNA dos parasitas através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

3. HIPÓTESE

Comprovar com análises moleculares a presença do parasita *Henneguya* sp. isolado de peixes em fase inicial de criação do Estado do Mato Grosso do Sul.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Atualmente o Brasil é considerado um dos países com a mais rica fauna de peixes de água doce, despertando assim um grande potencial na aquicultura (Buckup *et al.*, 2007). Este fato deve-se ao país apresentar características favoráveis para o cultivo como disponibilidade de recursos hídricos, clima favorável, mão-de-obra abundante, geração e difusão de

tecnologias, disponibilidade de insumos e crescente demanda por pescado no mercado interno (Kubitza *et al.*, 2007).

A aquicultura é um setor da agropecuária brasileira que está em constante crescimento, pois vem desempenhando um papel respeitável sob a economia do país, sendo assim considerado como um mercado estratégico no desenvolvimento sustentável por representar uma fonte proteica saudável na alimentação humana (Woo, 2006).

No Estado do Mato Grosso do Sul o cultivo de peixes tem sido uma das perspectivas de expansão agropecuária no estado, graças à pesca de algumas espécies com grande potencial no mercado, como é o caso do surubim híbrido, o qual se destaca na produção intensiva por apresentar crescimento rápido, potencial para exploração industrial, domesticação facilitada e padrão exigido para exportação (Rotta, 2003).

Surubim, é o nome popular dado as espécies de *Pseudoplatystoma* sp., um peixe da família *Pimelodidae,* encontrado nas principais bacias hidrográficas sul-americanas e do estado do Mato Grosso do Sul. Esta família compreende oito espécies, dentre elas o surubim-cachara ou cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) e o surubim-pintado ou pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), estes quando cruzados dão origem a um híbrido fértil, chamado de surubim-híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* ♀ x *Pseudoplatystoma corruscans* ♂), conhecido popularmente como ponto e vírgula (Ishikawa et al., 2011).

Esses peixes de água doce são considerados nobres e apreciados tanto no mercado nacional, quanto internacional, por apresentarem propriedades organolépticas excelentes, como carne saborosa, coloração clara, textura firme, baixo teor de gordura e ausência de espinhos intramusculares, agregando assim um alto valor econômico e características zootécnicas desejáveis, o que asseguram grande aceitação na sua comercialização, despertando assim o interesse dos criadores de peixes (Crepaldi *et al.*, 2006). Por serem provenientes de ambientes naturais e artificiais, estes são passivos de serem infectados por espécies de parasitas protozoários que podem ser encontrados nas superfícies do corpo ou nos órgãos internos (Pavanelli *et al.*, 2002).

Estes peixes são híbridos férteis, originados do cruzamento de indivíduos ou grupos geneticamente diferenciados, tanto entre linhagens de uma mesma espécie, quanto de espécies diferentes (Bartley *et al.*, 2001). O cruzamento genético destes peixes tem o intuito de agregar, as características que são desejáveis de espécies ou linhagens distintas dentro de um mesmo grupo genético, apresentando superioridade para as características de interesse (Resende *et al.*, 2010). Dessa forma, os híbridos são considerados comercialmente vantajosos

e normalmente apresentam resistência a doenças e capacidade de tolerar variações ambientais, além de ótima qualidade da carne e da taxa de crescimento (Toledo-Filho *et al.*, 1998).

No entanto, apesar das vantagens e dos valores agregados destes híbridos, o cultivo intensivo dos mesmos, devido a grande demanda do mercado interno e externo, tem favorecido o surgimento de enfermidades parasitárias, que podem comprometer ou até mesmo inviabilizar economicamente a criação, causando assim sérios prejuízos para os criadores (Dias *et al.*, 2004). Portanto, o sucesso da aquicultura depende de aspectos sanitários como profilaxia, diagnóstico e terapêutica (Luque, 2004a; Pavanelli *et al.*, 2008). Entretanto, dados sobre a epidemiologia na cadeia produtiva destes peixes ainda são escassos para a maioria das espécies cultivadas, o que dificulta a implementação de técnicas de manejo e de cultivo que possam reduzir a necessidade de intervenção sanitária para o controle de doenças.

Neste contexto, os protozoários do filo *Myxozoa* (*Mixosporídeos*), endoparasitas frequentemente encontrados em órgãos de peixes marinhos e de água doce, são considerados como os principais responsáveis por perdas econômicas na criação de peixes (Pavanelli *et al.*, 2008).

Os *Mixosporídeos* compreendem dois principais gêneros causadores de doenças em peixes, o *Henneguya* sp. que compreende cerca de 32 espécies descritas na América do Sul e o *Myxobolus* sp. com aproximadamente 18 espécies em peixes de água doce (Adriano *et al.*, 2002). Os *Myxobolus* são parasitas que apresentam esporos arredondados, providos de duas cápsulas polares alongadas. Já os pertencentes ao gênero *Henneguya* possuem esporos alongados e dois filamentos polares longos que formam seus cistos preferencialmente nos filamentos e arcos branquiais (Martins, 1997; Eiras, 2002). Podem ser tanto parasitas histozóicos (intercelulares, intracelulares ou de luz de vasos) ou celozóicos (na cavidade dos órgãos, flutuando ou ligados à superfície epitelial interna dos mesmos), além de serem estenoxeno (ou seja, atacam apenas uma única espécie, porém podem albergar dezenas de espécies de *Mixosporídeos*) (Eiras *et al.*, 2006).

Sendo assim, estes podem ser identificados através da presença de cistos subcutâneos que são visíveis a olho nu, pois ocasionalmente podem provocar algumas deformações na superfície corporal, ou pelos cistos presentes nos órgãos internos, como na brânquia, fígado, baço e rim, conferindo assim um aspecto granular ao mesmo, ou produzindo manchas esbranquiçadas em sua superfície (Thatcher & Brites-Neto, 1994).

O ciclo de vida do gênero *Henneguya* ainda é desconhecido, no entanto sabe-se que são semelhantes à oligoquetas e atuam como hospedeiros intermediários; apresentando também as

fases de actinosporo que penetram ativamente no epitélio branquial, dando início assim à formação dos plasmódios, que se desenvolvem até formarem os cistos macroscópicos (nos plasmódios existem células que vão se relacionar com as células do hospedeiro, absorvendo os nutrientes para o desenvolvimento dos esporos); por fim quando maduros, os cistos se rompem e liberam os esporos na água que darão continuidade ao ciclo de vida do parasita (Ishikawa *et al.*, 2012).

A forma infectante dos oligoquetas refere-se aos esporos que serão liberados a partir dos cistos maduros que irão se romper dentro dos peixes; por outro lado, para os peixes, a forma infectante são os actinosporos que serão liberados pelos oligoquetas (Ishikawa *et al.*, 2012).

A presença destes parasitas pode causar sérios danos ao hospedeiro, como hemorragias, lesões cutâneas, focos inflamatórios nas brânquias e superfície corporal, redução da eficiência respiratória e alterações comportamentais, dependendo do órgão parasitado (Martins *et al.*, 1997). Em alguns casos mais graves podem resultar em uma doença chamada Mixosporidíase, causada pelos diferentes gêneros de *Mixosporídeos*, sendo que o gênero *Henneguya* tem demonstrado um maior impacto sobre as condições de saúde desses peixes, sendo considerados com maior frequência nos monitoramentos sanitários (Ishikawa *et al.*, 2012).

A transmissão do *Henneguya* ocorre somente quando a forma infectante do parasita entra em contato com o peixe, isso pode ocorrer em ambientes de criação que apresente como fonte de infecção os hospedeiros intermediários, ou até mesmo em situações onde os peixes entram em contato com água que esteja contaminada com a forma infectante do parasita (Ishikawa *et al.*, 2012). Portanto, é importante que estudos de caracterização do perfil parasitológico dessas espécies sejam realizados, uma vez que contribuem para o monitoramento sanitário e para o controle da disseminação dos parasitas que geram desequilíbrio nos ecossistemas aquáticos (Luque, 2004b).

A classificação e identificação dos *Mixosporídeos* são baseadas em características morfológicas dos esporos como o formato, tamanho e dimensões, bem como na especificidade do hospedeiro, órgãos e/ou tecidos de infecção (Lom e Arthur, 1989). Contudo, a partir do final do século XX, análises moleculares tornaram-se uma importante ferramenta no estudo de parasitas do filo *Myxozoa*, uma vez que a apenas métodos morfológicos dificulta a classificação, devido à alta similaridade morfológica que partilham. Desta forma, o uso conjunto de técnicas moleculares aumenta a qualidade e confiabilidade dos resultados, tornando-se uma ferramenta útil em estudos que visam traçar o perfil sanitário da criação de peixes (Molnár *et al.*, 2002).

As técnicas de biologia molecular além de serem usadas nos estudos taxonômicos de *Mixosporídeos* (Adriano *et al.*, 2009; Adriano *et al.*, 2012), são úteis na elucidação do ciclo de vida (Atkinson e Bartholomew, 2009) e no estudo de hipóteses filogenéticas. O estudo conjunto de técnicas morfológicas e moleculares é capaz de propor a determinação taxonômica, a qual é essencial para chegar às generalizações e conclusões sobre a ecologia, patogenicidade e epidemiologia destes parasitas (Carriero, 2011).

Várias são as técnicas de biologia molecular que tem sido utilizada no diagnóstico de doenças e na caracterização molecular de parasitas, dentre elas, destaca-se a Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase - PCR), um método sensível na detecção de agentes infecciosos e parasitários (Figueiredo; Leal, 2008). A PCR possibilita a amplificação de sequências do ácido desoxirribonucleico (DNA) que estejam presentes em misturas complexas e permite obtenção de quantidades de DNA suficientes para sequenciamento e análises sobre a diversidade genética de populações (Oliveira *et al.*, 2007). A extração e purificação de ácidos nucléicos a partir de diversas amostras experimentais (parasitas, bactérias, fungos, tecidos vegetais e tecidos animais) é uma etapa fundamental para obter sucesso na amplificação do DNA (Oliveira *et al.*, 2007).

Considerando a importância da criação de surubim híbrido para o estado do Mato Grosso do Sul e, contrariamente a este fato, a falta de estudos sanitários destes peixes, este trabalho teve como objetivo identificar *Mixosporídeos* isolados de criadouros comerciais de peixes em fase inicial de criação do estado do Mato Grosso do Sul (MS) através da técnica de PCR no intuito de complementar os dados morfológicos e traçar o perfil parasitológico desses parasitas. Acredita-se que estes resultados irão auxiliar no controle e profilaxia dos mesmos, resultando em melhorias econômicas para a produção de alevinos no MS.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. 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 avaliados foram adquiridos através da retirada dos arcos branquiais dos peixes que macroscopicamente apresentaram lesões indicativas da infestação cística e/ou

positivos na microscopia óptica realizada *in loco* do muco do tegumento ou branquial. Para observação dos arcos branquiais, os mesmos foram cuidadosamente removidos, separados e acondicionados entre lâmina e lamínula mais solução salina 0,65%. As lâminas que apresentaram resultado positivo para a presença de parasita foram submetidas às análises moleculares.

5.2. Desenho de Oligonucleotídeos iniciadores

Com base em informações depositadas no GenBank, foram selecionadas sequências específicas do RNA ribossomal (rRNA) 18S de *Henneguya*. As sequências foram alinhadas através de ferramentas da bioinformática, com o programa ClustalX que realiza um alinhamento global entre as mesmas, para identificar as regiões conservadas. Por fim, com o auxílio do programa, Vector NTI® 11.0 foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores específicos para a região rDNA, tendo como base as regiões conservadas identificadas no alinhamento.

5.3. Extração e Purificação de DNA genômico

Os parasitas isolados dos surubins híbridos foram submetidos a cinco protocolos distintos de extração de DNA, com o intuito de comparar a eficiência destes na obtenção de DNA genômico dos parasitas: 1) protocolo utilizando brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB), segundo o descrito por Hallett, *et al.*, (2001); 2) protocolo utilizando partículas de sílica, baseado no trabalho de Boom, *et al.*, (1990); 3) protocolo utilizando Fenol-Clorofórmio modificado, baseado no trabalho de Bardakci e Skibinski, (1994); 4) protocolo utilizando uma solução de precipitação proteica, segundo Crispim, *et al.*, (2010); 5) Kit de extração DNeasy Blood & Tissue Kit, (QIAGEN). Para isso foram utilizadas 20 mg de órgãos (brânquia, fígado, rim e baço) dos peixes contendo o parasita ou o próprio cisto do parasita isolado. As amostras foram maceradas com 200 µL de TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCL pH 8,0) em um tubo *eppendorf* de 1,5 mL e com o auxílio de um palito de madeira, com exceção do protocolo de Fenol-Clorofórmio, onde as amostras foram maceradas com nitrogênio liquido.

Todos os sedimentos obtidos foram suspensos em 30 µL de TE e estocados a -20ºC para posterior análise molecular. Os protocolos testados estão descritos a seguir:

1) Protocolo utilizando Brometo de Hexadeciltrimetilamônio (CTAB)

As amostras de parasitas foram submetidas à lavagem durante 48 horas em Tris-EDTA (1 M), posteriormente foi adicionado Proteinase K (20 mg mL^{-1}) e incubado a 37 ºC por 1 hora. Em seguida foi acrescentado NaCl (5 M) e CTAB (1 %), incubado a 65 ºC por 10 min. Após foi adicionado Fenol/Clorofórmio (100 %) e centrifugado por 10 min a 14.000 rpm. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e adicionado Isopropanol frio (100 %), centrifugado e desprezado o sobrenadante. O pellet foi lavado com Etanol Gelado (70 %), centrifugado, ressuspendido em Água Milli-Q estéril e armazenado a - 20 ºC até sua utilização.

2) Protocolo utilizando Partículas de Sílica modificado

Na amostra dos parasitas foram adicionados Sílica, Tampão L6 (Isotiocianato de Guanidina 98 %, Triton 100 ×, EDTA 0,5 M e Tris-HCl 0,1 M), e submetidos à centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com o Tampão L2 (Isotiocianato de Guanidina 98 % e Tris-HCl 0,1 M), centrifugado e descartado o sobrenadante (repetiu o procedimento). O pellet foi lavado com Etanol Gelado (70 %), centrifugado e descartado o sobrenadante (repetiu o procedimento), seguido de uma lavagem com Acetona Gelada (100 %), centrifugado e descartado o sobrenadante. Foi adicionado Água Ultrapura, incubado a 56 ºC por 15 min., centrifugado e coletado o sobrenadante, e incubado a 45 ºC por 15 min. e armazenado a – 20 ºC.

3) Protocolo utilizando Fenol-Clorofórmio modificado

Os parasitas foram macerados com Nitrogênio Líquido e acrescidos de Tampão de Extração (Tris-HCl 1 M, EDTA 0,5 M, NaCl 5 M, Dodecil Sulfato de Sódio 5 M), Proteinase K (20 mg mL^{-1}) e incubado a 60 ºC por 2 h. Posteriormente foi adicionado NaCl (5 M), centrifugado e o sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado Etanol Absoluto e

incubado à - 20 ºC por 2 h. Em seguida foi centrifugado, o pellet lavado com Etanol (70 %), eluido em Tris-EDTA (1 M) e armazenado a - 20 ºC até a sua utilização.

4) Protocolo utilizando Solução de Precipitação Proteica

Foram adicionados à amostra dos parasitas Proteinase K (20 mg mL^{-1}), Dodecil Sulfato de Sódio (20 %) e incubado a 60 ºC por 90 min. Posteriormente foram adicionados Fenol/Clorofórmio (100 %), Solução de Precipitação Proteica (Acetato de Potássio 5 M e Ácido Acético Glacial 99,5 %), centrifugado e transferido a fase aquosa para outro tubo onde foram adicionados Etanol Absoluto, centrifugado e desprezado o sobrenadante. O pellet foi lavado com Etanol (70 %), eluído em Tris-EDTA (1 M) e armazenado a - 20 ºC.

5) Kit de Extração DNeasy Blood & Tissue Kit

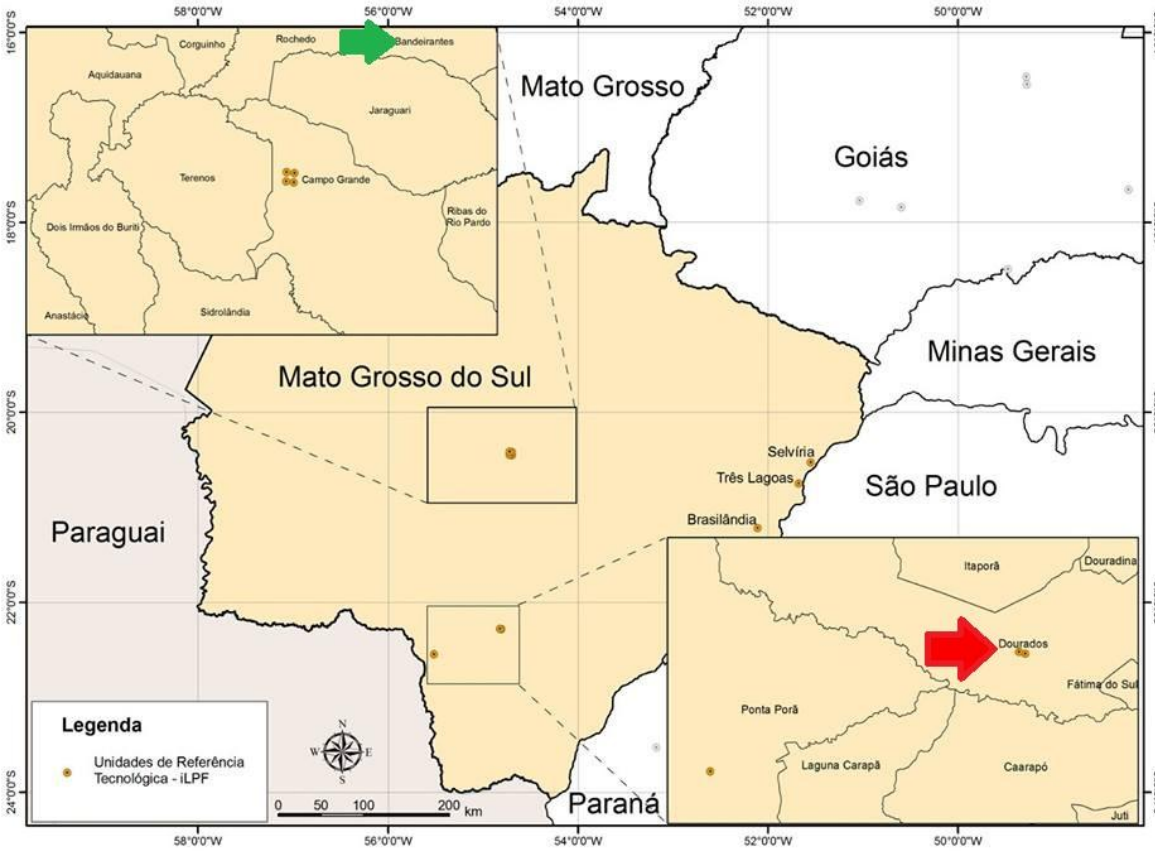
Esse protocolo foi realizado conforme instruções do fabricante (QIAGEN).

5.4. Amplificação do rDNA dos *Mixosporídeos* através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA genômico dos parasitas foi amplificado através da Reação em cadeia da Polimerase (PCR), com o auxílio da enzima *Taq* DNA Polimerase (Sigma). As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 2 U de DNA Taq polimerase (Sigma), 50 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 200 µM de cada dNTP, 1 × tampão de reação, 1,5 mM $MgCl_2$ e 10-50 ng de DNA. As reações de amplificação foram conduzidas no termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf), com as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial a 95 ºC por 5 min., seguida de 35 ciclos de amplificação com desnaturação a 95 ºC durante 1 min., anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores no gradiente de temperatura de 50 ºC, 55,5 ºC, 60,8 ºC, 63,5 ºC e 66 ºC por 1 min., e extensão a 72 º C por 1 min., seguida de uma extensão final a 72 ºC por 7 min. Posteriormente os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1 % corado com GelRed (Uniscience), juntamente com um padrão de peso molecular (100 bp, Gibco BRL, Sydney).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

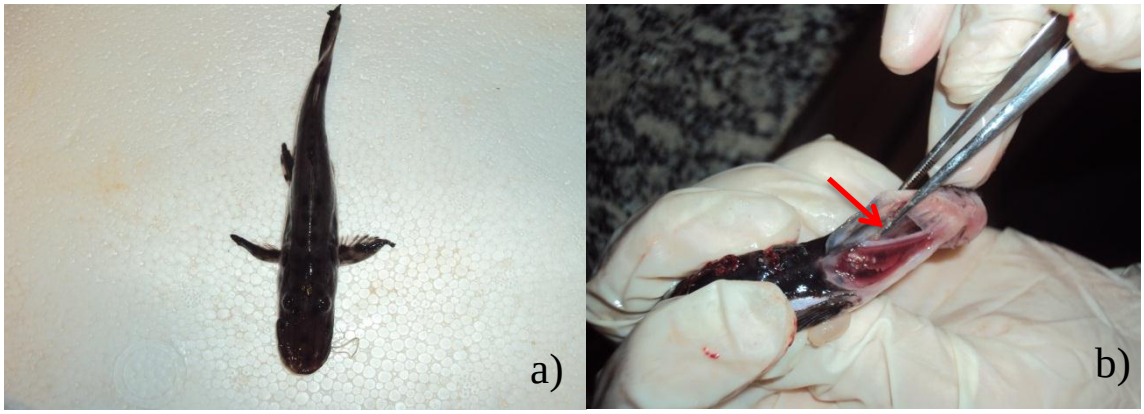
Foram realizadas três coletas de surubim híbrido de criação, disponibilizados pela empresa Mar & Terra, localizada no município de Bandeirantes, Mato Grosso do Sul, como ilustrado na Figura 1.



EMBRAPA 2010. Disponível em: www.cnpgl.embrapa.br

Figura 1 - Mapa ilustrativo da região de Bandeirantes (seta verde) e da região de Dourados (seta vermelha)

Os peixes adquiridos foram então analisados, sendo o diagnóstico feito principalmente por meio da identificação macroscópica do esporo do parasita no tecido do órgão alvo (rim, fígado, baço e principalmente brânquia), por apresentarem lesões indicativas da infecção cística (Figura 2).

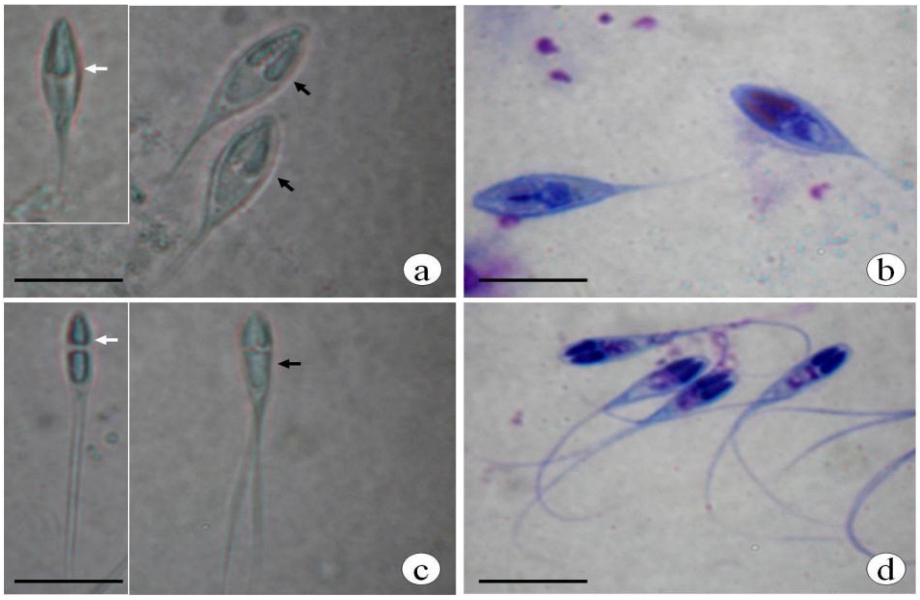


Pádua e Carrijo-Mauad 2012.

Figura 2 – a) Coleta de Juvenil de surubim híbrido b) Análise macroscópica da brânquia de Surubim, para identificar a presença ou não de cistos de *Mixosporídeos*, como indicado pela seta vermelha.

Posteriormente estes foram submetidos a análises de lâminas com raspagens a partir da mucosa do tegumento e branquial, realizados a fresco e coradas com Giemsa, visualizadas sob microscopia óptica (Figura 3).

As análises anatopatológicas realizadas sugerem que *Mixosporídeos* pertencentes ao gênero *Henneguya* estavam presentes nas brânquias e demais órgãos internos de alguns surubins, porém não foram feitas análises quantitativas desses parasitas.



Pádua e Carrijo-Mauad 2012.

Figura 3 - *Henneguya* sp. parasita de brânquias de surubim híbrido. *Henneguya corruscans* observada em microscopia óptica no exame a fresco (a), com esporo em posição frontal (a – seta preta) e posição lateral (a – seta branca), e corado com Giemsa (b). *H. pseudoplatystoma* observada em microscopia óptica no exame a fresco (c), com esporo em posição frontal (c – seta preta) e posição lateral (c – seta branca), e corado com Giemsa (d). Barra= 10 µm

De acordo com Pádua *et al.*, 2012 os principais patógenos diagnosticados à campo em alevinos de surubim híbrido são os parasitas, juntamente com bactérias. Neste estudo foi observado a presença de parasitas nos peixes analisados, sendo que o raspado do tegumento e branquial sugere ser do gênero *Henneguya*.

Após as análises macro e microscópicas, as amostras positivas tiveram seus órgãos e cistos coletados e estocados a - 20 ºC para posteriormente serem submetidas à caracterização molecular.

Através das análises de bioinformática foram selecionadas sequências conservadas dos *Mixosporídeos* e submetidas ao desenho de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o DNA ribossomal 18S (Tabela 1).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene 18S rRNA de *Henneguya.*

Espécie	Nome do Oligonucleotídeo Iniciador	Sequência do *Primer*
Henneguya sp.	NEM 18SF *Forward*	5` CGCGAATRGCTCATTACAACAGC 3`
	NEM 18SR *Reverse*	5` GGGCGGTATCTGATCGCC 3`

A extração de DNA foi realizada com vários protocolos no intuito de padronizar um protocolo que apresentasse melhor custo-benefício, por este motivo foram testados 4 diferentes protocolos, no entanto, apenas o protocolo de Fenol-Clorofórmio modificado apresentou uma leve banda visualizada no gel de agarose a 1% corado com GelRed (Uniscience) (Figura 4). Porém a amplificação por PCR deste DNA não foi relevante, possivelmente devido ao fato do parasita estar inserido na brânquia do hospedeiro e a extração ter sido realizada através do conjunto (brânquia-parasita). Desta forma, acredita-se que o DNA extraído talvez possa ser do Surubim.

Hallet *et al.*, 2001 afirma que através do protocolo utilizando o brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) foi possível realizar a extração de DNA do *Henneguya*. Porém, quando testamos este protocolo não obtivemos DNA extraído. Já os demais protocolos testados não eram específicos para a extração de ácidos nucleicos de *Henneguya*, porém foram testados a fim de tentar padronizar um protocolo alternativo, porém não obtivemos sucesso.

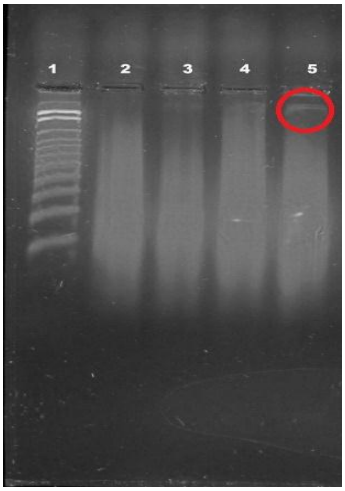


Figura 4 - Resultado da eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience) do DNA genômico extraído com os quatro protocolos testados. Coluna 1: marcador de peso molecular *Ladder* 100 pb (Sigma); coluna 2: protocolo CTAB; coluna 3: protocolo solução proteica; coluna 4: protocolo com partículas de sílica - modificado; coluna 5: protocolo Fenol-Clorofórmio – modificado. O círculo vermelho na coluna 5 demonstra o DNA genômico de *Henneguya*.

A partir dos resultados ineficientes obtidos com os protocolos de extração de DNA genômico testados, fez-se necessário a obtenção do Kit de extração DNeasy Blood & Tissue Kit, (QIAGEN). Este kit possibilitou extrair DNA genômico do *Henneguya* com concentração e pureza satisfatória, conforme pode ser observado na Figura 5.

O kit Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega, Madison, WI, USA) também é muito utilizado na extração de DNA de *Henneguya* como citado por Adriano *et al.*, 2012, que descreveram a extração e purificação do DNA genômico de *Henneguya multiplasmodialis.*

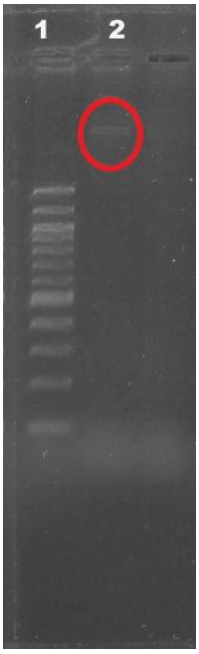


Figura 5 - Resultado da eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience) do DNA genômico extraído com kit comercial. coluna 1: marcador de peso molecular *Ladder* 100 pb (Sigma); coluna 2: o DNA genômico de *Henneguya*. O círculo vermelho na Coluna 2 demonstra o DNA genômico de *Henneguya*.

Para a padronização da técnica de PCR com o DNA extraído pelo Kit comercial, as condições foram otimizadas e foi observada a amplificação do DNA ribossomal de *Henneguya*, sendo que a temperatura de anelamento de 66ºC apresentou uma melhor concentração de produto amplificado.

A Figura 6 demonstra o resultado da amplificação do rDNA de *Henneguya*, o qual poderá ser utilizado em estudos futuros de sequenciamento e posterior análise filogenética para determinar a espécie do parasita.

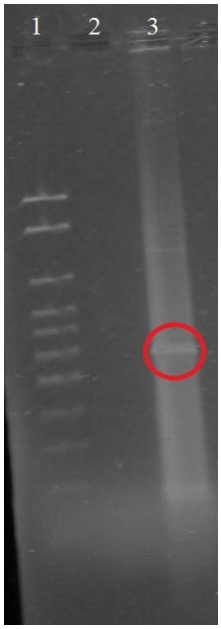


Figura 6 - Resultado da eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Uniscience) do DNA genômico amplificado pela técnica da PCR. coluna 1: marcador de peso molecular Ladder 100 pb (Sigma); coluna 2: controle negativo; coluna 3: PCR de *Henneguya* a 66ºC. O círculo vermelho na coluna 3 representa a amplificação do DNA genômico de *Henneguya*.

Martins (1997) descreve a necessidade demais estudos voltados a aquicultura e a criação de peixes, buscando avaliar as condições sanitárias no ambiente onde os peixes estão inseridos, no intuito de diminuir os impactos causados pelos patógenos. Nosso trabalho buscou padronizar técnicas moleculares que possam ser aplicadas ao estudo de identificação e caracterização de parasitas isolados das criações de peixes aqui do Estado do Mato Grosso do Sul. Acreditamos que este estudo, além de gerar conhecimento científico através de publicações científicas, irá contribuir para a melhoria dos indicadores sanitários das criações de peixes da região, gerando aumento da produção e maiores lucros aos criadores.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo permite concluir que a extração de DNA utilizado o Kit DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) apresentou bons resultados, o que possibilitou a amplificação do rDNA dos parasitas *Henneguya* sp. isolados de surubim híbrido na sua fase inicial de criação em criadores do MS.

A amplificação por PCR do DNA ribossomal do parasita utilizando os oligonucleotídeos iniciadores Nem 18F e NEM 18S foi realizado com sucesso, sendo mais eficiente na temperatura de anelamento a 66ºC; e estes resultados permitem comprovar a identidade dos parasitas do gênero *Henneguya*.

Nosso trabalho buscou padronizar técnicas moleculares que possam ser aplicadas ao estudo de identificação e caracterização de parasitas isolados das criações de peixes aqui do Estado do Mato Grosso do Sul.

Acreditamos que este estudo, além de gerar conhecimento científico através de publicações científicas, irá contribuir para a melhoria dos indicadores sanitários nas criações de peixes da região, gerando aumento da produção e maiores lucros aos criadores.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

O material amplificado na PCR será utilizado para o sequenciamento de DNA. Os resultados obtidos no sequenciamento possibilitarão avaliar a similaridade genética bem como identificar a espécie dos parasitas, uma vez que o DNA ribossomal é conservado entre as espécies e possibilita medir distâncias filogenéticas entre os organismos. Por fim, a identificação destes parasitas isolados dos peixes de criadouros comerciais do estado do Mato Grosso do Sul servirá de base para que medidas sanitárias possam ser criadas e dirigidas às espécies de parasitas circulantes, contribuindo para melhorias nos indicadores sanitários das criações de peixes do estado.

9. REFERÊNCIAS

Adriano, E. A.; Arana, S.; Alves, A. L.; Silva, M. R. M.; Ceccarelli, P. S.; Henrique-Silva, F.; Maia, A. A. M. *Myxobolus cordeiroi* n. sp., a parasite of *Zungaro jahu* (Siluriformes: Pimelodiade) from Brazilian Pantanal: morphology, phylogeny and histopathology. **Journal of Parasitology Veterinary**, v. 162, ed. 3-4, p. 221–229, 10 de junho de 2009.

Adriano, E. A.; Carriero, M. M.; Maia, A. A. M.; Silva, M. R. M.; Naldoni, J.; Ceccarelli, P. S.; Arana, S. Phylogenetic and host-parasite relationship analysis of *Henneguya*

multiplasmodialis n. sp. infecting *Pseudoplatystoma* spp. in Brazilian Pantanal wetland. **Journal of Parasitology Veterinary**, v. 185, ed. 2-4, p. 110–120, 30 de abril de 2012.

Adriano, E. A.; Ceccarelli, P. S.; Cordeiro, N. S. Prevalência de parasitos do filo Myxozoa em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Osteichthyes: *Characidae*) em rios do Pantanal Mato-grossense, Brasil. **Boletim Técnico (Cepta)**, Pirassununga, v. 15, p. 31-38, 2002.

Atkinson, S. D.; Bartholomew, J. L. Alternate spore stages of *Myxobilatus gasterostei*, a myxosporean parasite of three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) and oligochaetes (*Nais communis*). **Journal of Parasitology**, v. 104, ed. 5, p. 1173–1181, 1 de abril de 2009.

Bardakci, F.; Skibinski, D. O. F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species e subspecies identification. **Heredity**, v. 73, p. 117-123, 1994.

Bartley, D. M.; Rana, K.; Immink, A. J. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 10, p. 325-337, 2001.

Boom, R.; Sol, C. J.; Salimans, M. M.; Jansen, C. L.; Wertheim, D. P. M.; Noordaa, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, ed. 3, p. 495-503, março de 1990.

Buckup, P. A; Menezes, N. A; Ghazzi, M. S. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. 2 ed. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007. p. 195.

Carriero, M. M. **Taxonomia e filogenia molecular de *Myxozoa* parasitas de peixes de água doce oriundos de ambiente natural e de sistema de criação**. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Produtividade Animal) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Pirassununga: Universidade de São Paulo, 2011. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74131/tde-11082011-142445/>. Acesso em: 11-07-2013.

Crepaldi, D. V.; Faria, P. M. C.; Teixeira, E. A.; Ribeiro, L. P.; Costa, A. A. P.; Melo, D. C.; Cintra, A. P. R.; Prado, S. 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, ed. 3-4, p. 150-158, julho-dezembro de 2006.

Crispim, B. A.; Soares, J. S.; Cunha, C. M; Seno, L. O.; Grisolia, A. B. Avaliação de protocolos para extração de DNA genômico de sangue bovino**. Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão (ENEPE)**, Dourados, outubro de 2010.

Dias, P. G.; Furuya, W. M.; Pavanelli, G. C.; Machado, M. H.; Takemoto, R. M. Carga parasitária de *Rondonia* rondoni, Travassos, 1920, (Nematoda, Atractidae) e fator de condição do armado, *Pterodoras* granulosis, Valenciennes, 1833 (Pisces, Doradidae). **Biological Sciences,** Maringá, v. 26, ed. 2, p. 151-156, 2004.

Eiras, J. C. Synopsis of the species of the genus *Henneguya Thélohan*, 1892 (*Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae*). **Systematic Parasitology**, v. 52, ed. 1, p. 43-54, 2002.

Eiras, J. C.; Takemoto, R. M.; Pavanelli, G. C. **Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes**. 2 ed. Maringá: Editora Universidade Estadual de Maringá (Eduem), 2006. p. 199.

Figueiredo H. C. P.; Leal C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, suplemento especial, v.37, p. 8-14, 2008.

Hallett S. L.; Diamant A. Ultrastructure and small-subunit ribosomal DNA sequence of *Henneguya lesteri* n.sp. (*Myxosporea*), a parasite of sand whiting *Sillago analis* (Sillaginidae) from the coast of Queensland, Australia. **Diseases of aquatic organisms**, v. 46, p. 197-212, 8 de outubro de 2001.

Ishikawa, M. M.; Pádua, S. B.; Ventura, A. S.; Capecci, A. S.; Vendruscolo, A. B; Carrijo-Mauad, J. R. Infestação por ictio em Surubim Híbrido durante a fase inicial de criação**. Comunicado técnico 165 (Embrapa Agropecuária Oeste)**, Dourados, ed. 1, p. 1-5, abril de 2011.

Ishikawa, M. M.; Pádua, S. B.; Ventura, A. S.; Jerônimo, G. T.; Russo, M. R.; Carrijo-Mauad, J. R.; Martins, M. L. Biologia e Estratégias na Sanidade de Alevinos de Bagres Carnívoros. **Documentos 115 (Embrapa Agropecuária Oeste)**, Dourados, ed. 1, p. 1-47, dezembro de 2012.

Kubitza, F., Ono, E. A.; Campos, J. L. Os caminhos da produção de peixes nativos no Brasil: uma análise da produção e obstáculos da piscicultura. **Panorama da Aquicultura**, v. 17, n. 102, julho-agosto de 2007.

Lom, J.; Arthur, J. R. A Guideline for the Preparation of Species Description in *Myxosporea*. **Journal of Fish Diseases**, v. 12, ed. 2, p.151-156, março de 1989.

Luque, J. L. Biologia, epidemiologia e controle de parasitos de peixes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Ouro Preto, n.13, s. 1, p. 161-164, 2004.

Luque, J. L. Parasitologia de peixes marinhos da América do Sul: estado atual e perspectivas. In: Ranzani-Paiva, M. J. T.; Takemoto, R. M.; Lizama, M. A. P. **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Editora Varela, p. 199-215, 2004.

Martins, M. L. Doenças infecciosas e parasitárias de peixes com chave para identificação de patógenos. **Boletim Técnico do Centro de Aquicultura (CAUNESP)**, Jaboticabal, n. 3, p. 1-58, 1997.

Martins, M. L.; Souza, V. N.; Moraes, F. R.; Moraes; J. R. E.; Costa, A. J.; Rocha, U. F. Pathology and behavioral effects associated with *Henneguya sp.* (*Myxozoa: Myxobolidae*) infections of captive pacu *Piaractus mesopotamicus* in Brazil. **Journal of the World Aquaculture Society,** vol. 28, n. 3, p. 297-300, setembro de 1997.

Molnár, K.; Eszterbauer, E.; Sczékely, C.; Dán, À.; Harrach, B. Morphological and molecular biological studies on intramuscular *Myxobolus* spp. of cyprinid fish. **Journal of Fish Diseases**, v. 25, p. 643-652, 2002.

Oliveira, M. S. C.; Regitano, L. C. A.; Roese, A. D.; Anthonisen, D. G.; Patrocínio, E.; Parma, M. M.; Scagliusi, S. M. M.; Timóteo, W. H. B.; Jardim, S. N. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. São Carlos: **Embrapa Pecuária Sudeste**, 2007.

Pádua, S. B.; Ishikawa, M. M.; Kasay, R. Y. D.; Jerônimo, G. T.; Carrijo-Mauad, J. R. Parasitic infestations in hybrid surubim catfish fry (*Pseudoplatystoma reticulatum x P. corruscans*). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 3, p. 235-240, julho-setembro de 2012.

Pavanelli, G. C.; Eiras, J. C.; Takemoto, R. M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 2 ed. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá (Eduem), 2002. p 1-305.

Pavanelli, G. C.; Eiras, J. C.; Takemoto, R. M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 3 ed. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá (Eduem), 2008. p 1-311.

Resende, E. K.; Oliveira, C. A. L.; Legat, A. P.; Ribeiro, R. P. Melhoramento animal no Brasil: uma visão crítica espécies aquáticas. In: **Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal**, n.5, 2010, Maringá. Anais. Maringá: SBMA.

Rotta, M. A. Ictiômetro para biometria de surubins (pintado e cachara). **Comunicado técnico 28 (Embrapa Pantanal)**, Corumbá, ed. 1, p. 1-4, fevereiro de 2003.

Thatcher,V. E.; Brites Neto, J. Diagnóstico, prevenção e tratamento de enfermidades de peixes neo tropicais de agua doce . **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.16, n. 3, p. 111-128, 1994.

Toledo-Filho, S. A.; Almeida-Toledo, L. F.; Foresti, F.; Calcagnotto, D.; Santos, S. B. A. F., Bernardino, G. Programas genéticos de seleção, hibridação e endocruzamento aplicados à piscicultura. **Cadernos de Ictiogenética (CCS/USP)**, São Paulo, v. 4, p. 1-56, 1998.

Woo, P. T. K. Fish Diseases and Disorders: Protozoan and Metazoan Infections. **Fish disease and disorders**, Londres, v. 1, ed. 2, p. 1-791, 2006.