

Jan 01, 2025

Version 2

Protocolo para o Ensaio de Citotoxicidade com Zebrafish usando Extratos de Cianobactérias V.2

DOI

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.eq2ly6ebegx9/v2>

Ricardo Borges¹

¹UFRJ

LAABio-IPPN-UFRJ



Ricardo M. Borges

UFRJ

Create & collaborate more with a free account

Edit and publish protocols, collaborate in communities, share insights through comments, and track progress with run records.

Create free account

OPEN  ACCESS



DOI: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.eq2ly6ebegx9/v2>

Protocol Citation: Ricardo Borges 2025. Protocolo para o Ensaio de Citotoxicidade com Zebrafish usando Extratos de Cianobactérias. protocols.io <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.eq2ly6ebegx9/v2> Version created by **Ricardo M. Borges**

License: This is an open access protocol distributed under the terms of the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited



Protocol status: Working

We use this protocol and it's working

Created: January 01, 2025

Last Modified: January 01, 2025

Protocol Integer ID: 117498

Keywords: cytotoxicity assays in zebrafish, citotoxicidade com zebrafish usando extratos de cianobactérias este, zebrafish usando extratos de cianobactérias este, cytotoxicity assay, zebrafish, citotoxicidade com, organismos vivo, use of live organism, live organism, organism handling, protocolo para, compliance with ethical regulation

Abstract

Este protocolo detalha os passos para realizar ensaios de citotoxicidade em zebrafish (*Danio rerio*), incluindo a preparação de soluções, o manejo dos organismos e os controles necessários. Certifique-se de seguir as regulamentações éticas para o uso de organismos vivos em pesquisa.

English:

This protocol outlines the steps to perform cytotoxicity assays in zebrafish (*Danio rerio*), including solution preparation, organism handling, and necessary controls. Ensure compliance with ethical regulations for the use of live organisms in research.

Guidelines

Considerações Éticas e Regulatórias

- Submeta o projeto ao comitê de ética em experimentação animal (CEUA) da sua instituição antes de iniciar.
- Certifique-se de que os experimentos seguem as normas da ARRIVE guidelines (Kilkenny et al., 2010) e as legislações locais.
- Evite interferências: Realize um pré-teste para determinar se o solvente (ex.: DMSO) tem efeito citotóxico.
- Replicabilidade: Realize experimentos em diferentes lotes para verificar consistência.
- Segurança: Descarte os resíduos do experimento seguindo protocolos de biossegurança.

Materiais Necessários

1 Equipamentos e Instrumentos

- Sistema de manutenção de zebrafish (tanques com controle de temperatura e pH)
- Microseringas ou micropipetas de 1-10 μL
- Placas de 96 poços
- Microscópio estereoscópico
- Sistema de aeração e filtração de água

Reagentes

- Extratos de cianobactérias (em solução aquosa, metanólica ou outra)
- Meio de cultura para zebrafish (E3 Medium: NaCl, KCl, CaCl_2 , MgSO_4)
- DMSO (Dimetilsulfóxido, para dissolução de compostos)
- Controle positivo (Ex.: Doxorrubicina ou outro agente citotóxico conhecido)
- Controle negativo (DMSO diluído ou veículo do extrato)
- Azul de metileno ou outro corante vital para avaliação de mortalidade
- Água destilada ou ultrapura

Zebrafish

- Embriões com até 72 horas pós-fertilização (hpf) ou larvas com até 5 dias.

Preparação dos Organismos

2 1. Cruzamento dos zebrafish:

- Configure pares de zebrafish adultos em tanques de reprodução na proporção de 1:2 (machos:fêmeas).
- Colete os ovos e lave-os com o meio E3.
- Incube os embriões a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ até atingirem o estágio desejado (≤ 72 hpf ou larvas ≤ 5 dias).

2. Triagem de embriões/larvas:

- Examine os embriões/larvas sob o microscópio.
- Exclua aqueles com malformações ou desenvolvimento anormal.

Preparação das Soluções de Teste

3 Diluição do extrato:

- Prepare uma solução estoque do extrato em DMSO ou outro solvente apropriado (ex.: 10 mg/mL).
- Dilua a solução estoque no meio E3 para obter concentrações finais desejadas (ex.: 0,1 – 100 $\mu\text{g/mL}$).
- Garanta que a concentração final de DMSO não exceda 0,1% no poço.

Controles:

- Positivo: Use um agente citotóxico conhecido em diluições previamente testadas.
- Negativo: Meio E3 contendo 0,1% DMSO.

Setup do Ensaio

4 Distribuição nas placas:

- Use placas de 96 poços.
- Adicione 200 µL do meio E3 em cada poço.
- Alimente as larvas se necessário (para ensaios >24 h).

Adição de zebrafish:

- Adicione uma larva em cada poço usando pipetas Pasteur ou micropipetas (limpas e estéreis).

Adição dos tratamentos:

- Adicione os extratos diluídos e controles aos respectivos poços.
- Realize pelo menos três réplicas técnicas e biológicas.

Incubação

5 Incube as placas em um ambiente controlado a $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

- Monitore as larvas a intervalos regulares (6, 12, 24 e 48 horas).
- Certifique-se de que não haja contaminação e que as larvas estejam adequadamente oxigenadas.

Avaliação dos Resultados

6 Parâmetros de Citotoxicidade:

Mortalidade:

- Examine as larvas ao microscópio após 24 e 48 horas. Larvas imobilizadas e sem batimento cardíaco são consideradas mortas.

Mudança de Cor:

- Larvas mortas frequentemente perdem a transparência, tornando-se opacas ou esbranquiçadas.
- Alterações de pigmentação, como escurecimento ou formação de manchas

Malformações:

- Observe possíveis alterações na morfologia, como deformações no eixo corporal ou edema.



Atividade locomotora:

- Teste a resposta ao estímulo luminoso.

Cálculo da concentração letal:

- Determine a CL50 (Concentração Letal 50%) usando métodos estatísticos, como Probit ou regressão logística.

Documentação:

- Registre as concentrações testadas, efeitos observados e anote dados qualitativos.