

## OBTENÇÃO DO DNA GENÔMICO DE *CYPHOCHARAX VOGA* E *OLIGOSARCUS JENYNSII* ATRAVÉS DE PROTOCOLO “IN HOUSE”

WELINTON SCHRÖDER REINKE<sup>1</sup>; DAIANE MACHADO SOUZA<sup>2</sup>; SUZANE FONSECA FREITAS<sup>2</sup>; JUVÊNCIO LUIS OSÓRIO FERNANDES POUHEY<sup>2</sup>; HEDEN LUIZ MARQUES MOREIRA<sup>2</sup>; NELSON JOSÉ LAURINO DIONELLO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – welintonreinke19@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – dsdaianesouza@gmail.com; suzane.ff@hotmail.com; juvencio@ufpel.tche.br ; heden.lui@gmail.com

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas – dionello.nelson@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

*Cyphocharax voga* (Hensel, 1869) faz parte da família Curimatidae, conhecida popularmente como birú. É um peixe de pequeno porte com escamas prateadas que cobrem seu corpo, contendo pequenas manchas escuras na parte dorsal, sendo de maior visualização em peixes jovens. Tem grande ocorrência em lagoas costeiras da América Sul e do estado de Rio Grande do sul (CORRÊA et al., 2010).

*Oligosarcus jenynsii* (Günther, 1864) é conhecido popularmente por branca, dentado, peixe cachorro ou tambica, apresentando hábito alimentar carnívoro (NUNES et al., 2004). Essa espécie é encontrada em corpos de água na planície costeira do sul do Brasil, Uruguai e Argentina. Tem grande ocorrência no extremo sul do Brasil na região alagada denominada como Banhado do Taim (SILVEIRA et al., 2011).

O conhecimento sobre espécies nativas de peixes ainda é pouco, sendo fundamental entender mais sobre a genética das mesmas. Com informações genéticas pode se caracterizar indivíduos e avaliar a variabilidade genética daquela população (TREMEA et al., 2017).

O DNA é considerado a matéria prima para obtenção de informações gênicas e de grande importância para o desenvolvimento de pesquisas em populações. Para obter um DNA genômico de boa qualidade são feitos diversos estudos com objetivo de encontrar métodos mais adequados e de maior sucesso na sua extração (MARENGONI et al., 2006). Dentre eles, protocolos *in house*, no qual o preparo de reagentes a serem utilizados para a extração de ácidos nucleicos é realizada dentro do laboratório, configuram como uma alternativa viável e de baixo custo em comparação aos kits de extração disponíveis no mercado.

Considerando a existência de diversos protocolos utilizados para extração de DNA genômico, sendo muitos com valor de mercado elevado, o seguinte trabalho tem o objetivo de analisar a eficiência de um protocolo *in house* em amostras de fragmento de músculo das espécies *Cyphocharax voga* e *Oligosarcus jenynsii*.

### 2. METODOLOGIA

O material biológico foi coletado no Canal São Gonçalo, localizado na cidade de Pelotas-RS (52°23'18.06"O 31 e 31°48'39.06"S). Foram capturados 10 birús e 20 tambicas, totalizando 30 indivíduos. O material biológico coletado para análise genética consistiu em uma amostra de músculo (aproximadamente 200–300mg) de cada animal, os quais foram armazenados em etanol 70% e preservados a -

20°C até iniciarem as extrações de DNA genômico no Laboratório de Engenharia Genética Animal (LEGA) pertencente ao Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética (DEZG) do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas-UFPEL. O DNA genômico total, foi extraído usando separação orgânica pelo protocolo “in house” de Cloreto de Sódio proposto por BARRERO et al. (2008) com modificações, que consiste:

Maceração do tecido muscular, objetivando a ruptura da parede e membranas celulares, promovendo assim a liberação da molécula de DNA. Adição de 600 µL de solução tampão TNE1 (5 ml de tris HCl 1 Molar, pH 8.0, 10 ml de EDTA, 1ml de NaCl,), tendo por finalidade promover a lise das células, porém preservando sua estrutura, acidez e osmolaridade. Adição de 330 µL de TNE2 (5ml tris HCl 1 Molar pH 8,0; 10 ml EDTA, 1ml NaCl; 10 ml SDS 20%), como solução detergente para solubilização das membranas e auxiliando na inativação de enzimas; adição 4 µL de proteinase K (5 µg/ µL) e 3 µL RNase A (2,5 µg/ µL) para a desnaturação proteica e incubação imediata à 50°C *overnight*. Após a incubação, para precipitação de proteínas e restos celulares foram adicionados 340 µL de NaCl 5M; o material foi centrifugado a 12.000 rpm e transferido o sobrenadante para novos microtubos, onde foram acrescidos 900µL de etanol absoluto gelado para a precipitação do DNA. Posteriormente, foi realizada a lavagem do material com 200 µL de etanol 70% e por fim, o DNA foi ressuscitado com 100 µL de água milli-q. Para checagem da integridade do DNA obtido, as amostras foram submetidas a eletroforese horizontal com gel de agarose 1% e tampão SB1X durante 40 minutos a 120 volts. Para tal, foi usada uma alíquota de 7 µL de DNA sendo o mesmo corado com 1.1 µL de *GelRed* (Biotium, USA) e 1.1µL de *Loading Buffer* 5X; bem como *Gene Ruler DNA Ladder Mix* (Fermentas Life Science) como referência para estimativa de peso molecular.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do uso do protocolo *in house* foi possível extrair DNA genômico satisfatório dos exemplares de *Cyphocharax voga* e *Oligosarcus jenynsii*. A presença da banda fluorescente no gel, significa a presença de DNA, como mostra as FIGURAS 1 e 2.

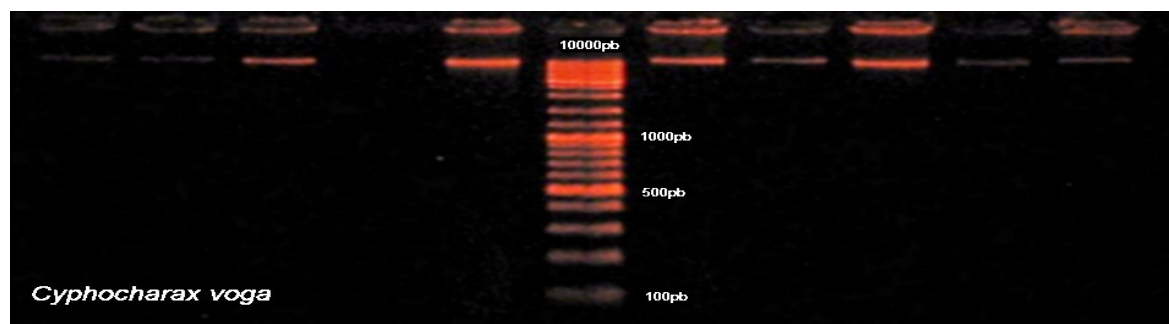


Figura 1. Perfil eletroforético mostrando presença de DNA genômico a partir de tecido muscular de *Cyphocharax voga*.

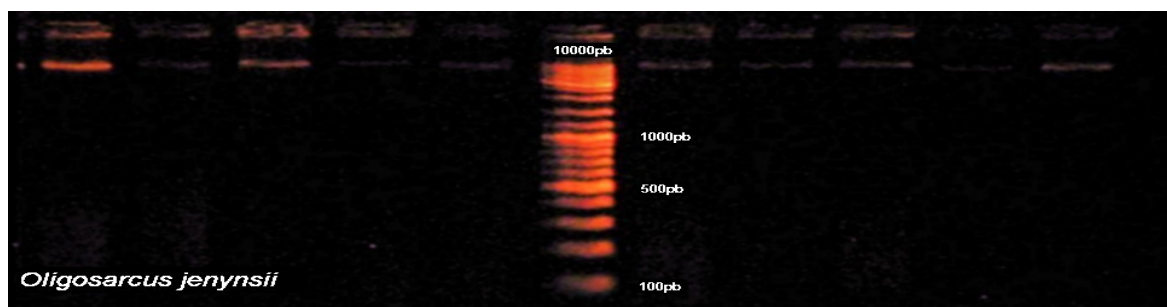


Figura 2. Perfil eletroforético mostrando presença de DNA genômico a partir de tecido muscular de *Oligosarcus jenynsii*.

Para MARENGONI et al. (2006) a forma de coleta e a conservação do tecido são consideradas de grande importância para a obtenção de DNA em concentração e qualidade adequada. A pureza do DNA é afetada significativamente pela qualidade do tecido anteriormente à extração, sendo assim recomendado utilizar o material mais fresco possível. Em uma extração de qualidade apenas uma banda íntegra deve aparecer, sem rastros e outras bandas, isso pode indicar degradação do DNA, excesso de proteína e presença de RNA. Existem diversos protocolos que permitem a extração de DNA de diferentes espécies animais e diferentes tecidos celulares, porém, alguns com um processo mais simples e outros mais laboriosos.

PARPINELLI; RIBEIRO (2009) em estudo com tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) testou para extração de DNA 3 protocolos: Fenol: Clorofórmio, Cloreto de Sódio (NaCl) 5M e CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio) onde os três obtiveram concentração de DNA suficiente para trabalhos que envolvam genética molecular. Sendo o protocolo Cloreto de Sódio (NaCl) 5M recomendado para a PCR pela praticidade em obtenção da amostra e rapidez do procedimento.

GARCIA et al. (2010) em estudo utilizando três protocolos *in house* ( Fenol – Clorofórmio, Cloreto de Sódio e Acetato de Amônia) obteve quantidade satisfatória de DNA no protocolo NaCl, porém observou aparentes níveis de degradação do DNA, o que não ocorreu nas amostras utilizadas neste estudo. O protocolo NaCl é seguro, rápido, de baixo custo e não contaminante, enquanto o protocolo fenol- cloroformio apresenta restrições pela sua toxicidade.

Em estudo realizado por ALMEIDA et al. (2012) foram utilizados 3 protocolos para extração de DNA genômico: Kit comercial *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen®) e dois protocolos modificados (método Salino e método Fenol-Clorofórmio). O kit comercial apresentou bandas de DNA de melhor qualidade e sem degradação, porém com custo elevado, permitindo a extração de um número limitado de amostras, sendo 50 amostras por kit.

O processo de extração deve resultar em DNA genômico em qualidade e quantidade suficiente, possibilitando desta forma a correta condução das etapas subsequentes da investigação científica (DOMINGUES et al., 2013). Visto isso o protocolo *in house* de Cloreto de Sódio, se mostrou uma boa alternativa para as duas espécies de peixe em questão.

#### 4. CONCLUSÕES

O método *in house* apresenta resultado satisfatório na extração de DNA genômico das espécies *Cyphocharax voga* e *Oligosarcus jenynsii*, se mostrando um protocolo eficiente e de baixo custo comparado aos existentes no mercado.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S.F.; BRITO, P.S.; NUNES, J.L.S.; COSTA, L.F.C. Comparação de metodologias para extração de DNA total de espécies de peixes marinhos. In: **64ª Reunião Anual da SBPC**, São Luís, MA, 2012, Anais... São Luís: Universidade Federal do Maranhão, 2012.

BARRERO, N.M.L.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; GOMES, P.C.; JACOMETO, C.B.; LOPES T.S. Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. **Ciencia e Investigacion Agraria**, v.35, n.1, p. 65-74, 2008.

CORRÊA, F.; ROCHA, B.H.G; PIEDRAS, S.R.N. Estudo isoenzimático em *Cyphocharax voga* (Hensel, 1869) (Characiformes, Curimatidae) no Arroio Corrientes, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Eletrônica de Biologia**, v. 3, n. 4, p. 106-124, 2010.

DOMINGUES, E.R.; ALVES, F.L.; DIAS, F.E.F. Extração do DNA das nadadeiras de peixe Zungaro Zungaro (Jaú) oriundos da bacia Araguaia, Tocantins. In: **9º SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFT**, 9., Palmas, 2013. Anais...Campus Palmas, 2013. v.5.

GARCIA, V.H.; TAVARES, R.A.; NUNES, M.D.; ALMEIDA, D.B.; MOREIRA, H.L.M. Comparação de protocolos de extração de DNA em diferentes tecidos de Peixe-rei para a análise de marcadores moleculares. In: **XIX CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 19., Pelotas, 2010. Anais...Campus Anglo, 2010.

MARENGONI, N.G.; MACHADO, M.F.; GASPARINO, E. Extração de DNA genômico em tecidos sólidos de peixes teleósteos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 99-106, jan./mar. 2006.

NUNES, D.M.; PELLANDA, M.; HARTZ, S.M. Dinâmica reprodutiva de *Oligosarcus jenynsii* e *O. robustus* (Characiformes, Characidae) na Lagoa Fortaleza, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Sér. Zool.** Porto Alegre, v. 94, n. 1, p. 5-11, março de 2004.

PARPINELLI, R.S.; RIBEIR, R.P. Estudo comparativo de protocolos de extração de DNA em diferentes tecidos de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*). **Gl. Sci. Technol.**, v. 02, n. 01, p. 22 - 33, jan/abr. 2009.

SILVEIRA, M.R.; BEMVENUTI, M.A.; MORESCO, A. Hábito alimentar de *Oligosarcus robustus* (MENEZES, 1969) e de *Oligosarcus jenynsii* (GÜNTHER, 1864), no sul do estado do Rio Grande do Sul. **Atlântica**. Rio Grande, v. 33, n. 1, p. 73-86, 2011.

TREMEA, M.; SANTOS, S.B.; GAZZOLA, S.S.; TAVARES, R.A. Identificação de Loci potencialmente amplificáveis em *Jurupoca* (Hemisorubim platyrhynchos). **Revista Brasileira de Iniciação Científica**, Itapetininga, v. 4, n. 5, 2017.