

OBTENÇÃO DO DNA GENÔMICO DE *GEOPHAGUS BRASILIENSIS* ATRAVÉS DE PROTOCOLO “IN HOUSE”

DEIVID LUAN ROLOFF RETZLAFF¹; SUZANE FONSECA FREITAS²;
FERNANDA BRUNNER HAMMES²; HEDEN LUIZ MARQUES MOREIRA³,
BRAYAN DANIEL BOHÓRQUEZ TEJADA⁴, RAFAEL ALDRIGHI TAVARES⁵

¹Universidade Federal de Pelotas, Curso de Zootecnia – deividluanrr@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – suzane.ff@hotmail.com; nanda5517@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia - heden.luiz@gmail.com

⁴ Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, curso de Medicina Veterinaria y Zootecnia – Bbohorquez@udca.edu.co

⁵Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Zootecnia – rafaaldrighi@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O *Geophagus brasiliensis* (QUOY e GAIMARD, 1824) é uma espécie de peixe nativa do Brasil, pertence à família dos Cichlidae e ordem dos Perciformes. Vulgarmente conhecido como Cará ou Acará, adapta-se muito bem a águas quentes e frias, podendo ser encontrado em todo Brasil (MOREIRA et al. 2013).

Hoje em dia ainda há pouco conhecimento sobre espécies de peixes nativos, especialmente sobre a variabilidade genética, dessa forma torna-se importante conhecer mais sobre a genética das mesmas. Com informações genéticas pode se caracterizar indivíduos e avaliar a variabilidade entre as populações (REINKE et al. 2018). A etapa inicial para realizar tais estudos é a extração do DNA genômico (FALEIRO et al. 2003).

Para à amplificação eficiente de sequencias precisa-se de quantidade e boa qualidade de DNA amostral. Para isto se faz necessário a busca por métodos de extração eficazes para cada espécie e tecido de interesse, visando baixo custo e o produto mais puro e íntegro possível. (GARCIA et al. 2010).

Existem vários métodos para extração do DNA, dentre eles, o protocolo *in house* (protocolo caseiro) pode ser uma boa alternativa, pois os reagentes utilizados são preparados no próprio laboratório. Sendo assim é de interesse deste trabalho analisar a eficiência de um protocolo *in house*, a partir de fragmentos de músculo, nadadeiras, escamas e sangue da espécie *Geophagus brasiliensis*.

2. METODOLOGIA

O material biológico (sangue 350µl, escamas 10 unidades, nadadeiras 500mg e músculo 500mg) de 20 indivíduos, foram fornecidos pelo Laboratório de Ictiologia da Universidade Federal de Pelotas - UFPel, os quais foram armazenados em etanol 70% até iniciarem as extrações de DNA genômico no Laboratório de Engenharia Genética Animal – LEGA/UFPel.

O DNA, foi extraído usando separação orgânica pelo protocolo *in house* de Cloreto de Sódio (NaCl) que consistem em: Maceração do tecido muscular, objetivando a ruptura da parede e membranas celulares, promovendo assim a liberação da molécula de DNA. Adição de 600µL de solução tampão TNE1 (5ml

de tris HCl 1 Molar, pH 8.0, 10ml de EDTA, 1ml de NaCl,), para promover a quebra das células, porém preservando sua estrutura, acidez e osmolaridade. Adição de 330 μ L de TNE2 (5ml tris HCl 1 Molar pH 8.0; 10ml EDTA, 1ml NaCl; 10ml SDS 20%), como solução detergente para solubilização das membranas e inativação de enzimas; adição 4 μ L de proteinase K (5 μ g/ μ L) e 3 μ L RNase A (2,5 μ g/ μ L) para a desnaturação proteica e incubação imediata à 50°C overnight. Após a incubação, para precipitação de proteínas e restos celulares foram adicionados 340 μ L de NaCl 5M; o material foi centrifugado a 12.000 rpm e transferido o sobrenadante para novos microtubos, onde foram acrescidos 900 μ L de etanol absoluto gelado para a precipitação do DNA. Posteriormente, foi realizada a lavagem do material com 200 μ L de etanol 70% e por fim, o DNA foi ressuspensionido com 50 μ L 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 μ L de DNA sendo o mesmo corado com 1.1 μ L de GelRed (Biotium, USA) e 1.1 μ L de Loading Buffer 5X; bem como Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas Life Science) como referência para estimação de peso molecular.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do método de extração do protocolo *in house*, foi possível extrair de forma satisfatória o DNA genômico das amostras. Assim como podemos ver na figura abaixo, a presença da banda fluorescente no gel, demonstra a presença de DNA.

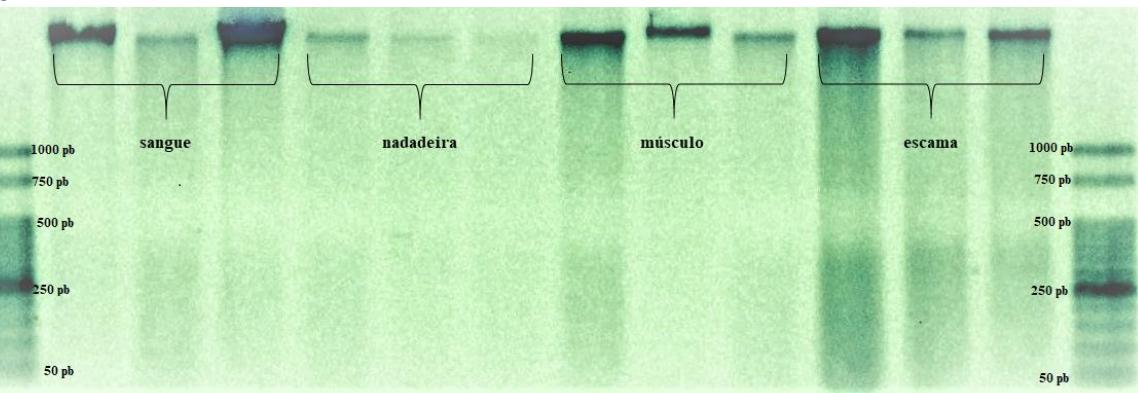


Figura 1– Eletroforese em gel de agarose, mostrando a presença de DNA

Os resultados obtidos neste trabalho se mostraram semelhantes aos encontrados por GARCIA et al. (2010) em um estudo utilizando três diferentes protocolos *in house* (Fenol – Clorofórmio, Cloreto de Sódio e Acetato de Amônia). Observou que o protocolo Fenol – Clorofórmio apresentou visualmente a melhor qualidade, com o protocolo Cloreto de Sódio (NaCl) alcançou quantidade satisfatória de DNA, porém as amostras apresentaram indícios de degradação.

PARPINELLI; RIBEIRO (2009) realizou um estudo avaliando 3 protocolos distintos para extração do DNA genômico: Fenol: Clorofórmio, Cloreto de Sódio (NaCl) 5M e CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio), onde observaram que os três protocolos utilizados obtiveram concentração de DNA suficiente. Recomendando o protocolo NaCl 5M para a PCR pela maior facilidade para obtenção do DNA.

O Protocolo Fenol – Clorofórmio demanda alto tempo para ser realizado, sendo utilizadas substâncias tóxicas para o organismo humano, já o protocolo

NaCl é uma alternativa simples, fácil, rápida e não contaminante para a obtenção de DNA em boa qualidade.

REINKE et al. (2018) em um estudo utilizando o protocolo *in house* por NaCl, para a extração do DNA de duas espécies nativas e conseguiu resultados satisfatórios na extração de DNA genômico, o mesmo ocorreu no presente trabalho com a espécie *Geophagus brasiliensis*.

DOMINGUES et al. (2013) realizou um trabalho visando a extração de DNA a partir de nadadeiras de *Zungaro Zungaro* (popularmente conhecido como Jaú), onde não obteve êxito na extração, diferente do ocorrido no presente trabalho. SILVA et al. (2014) em um trabalho com Tilápis do Nilo, utilizou quatro protocolos distintos para extração de DNA de nadadeiras, onde obteve resultados satisfatórios para os quatro protocolos, semelhante ao que ocorreu neste trabalho com o protocolo *in house*.

Visando o bem-estar animal, recomenda-se a utilização de métodos menos agressivos aos animais. Desse modo aconselha-se utilizar nadadeiras e escamas, para realizar a extração de DNA em peixes, principalmente para animais utilizados para reprodução, pois para a coleta destes materiais biológicos não há necessidade de abater o indivíduo.

O processo de extração deve resultar em DNA genômico suficientemente satisfatório, possibilitando a amplificação do DNA e posteriores estudos científicos (REINKE et al., 2018). Desta forma o protocolo *in house* por NaCl, se mostrou uma boa opção para a espécie em questão.

4. CONCLUSÕES

O método *in house* por NaCl apresenta resultado satisfatório na extração de DNA genômico da espécie *Geophagus brasiliensis*, se mostrando um protocolo rápido, eficiente e de baixo custo comparado aos existentes no mercado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 SEMINARIO DE INICIAÇÃO CIENTIFICA, Palmas, 2013. Anais... Palmas: UFT, 2010.

FALEIRO, F. G.; FALEIRO, A. S. G.; CORDEIRO, M. C. R.; KARIA, C. T. Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado visando análises moleculares. **Comunicado Técnico 92**. Planatina, DF. EMBRAPA. N. 1. 2003. ISSN 1517-1469.

GARCIA, V.H.; TAVARES, R.A.; NUNES, M.D.; ALMEIDA, D.B.; MOREIRA, H.L.M.; DIONELLO N. J. L. 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... Pelotas: UFPel, 2010.

MOREIRA, A. P. EFEITO DOS METAIS PESADOS EM ORGANISMOS AQUÁTICOS: O USO DO *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) COMO BIOINDICADOR. Criciuma: UNESC, 2013.

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

REINKE, W.S.; SOUZA, D.M.; FREITAS, S.F.; POUHEY, J.L.O.F; MOREIRA, H.L.M.; DIONELO, N.J.L; Obtenção do dna genômico de cyphocharax voga e

oligosarcus jenynsii através de protocolo “in house”. In: **XXVII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 27, Pelotas, 2018. Anais... Pelotas: UFPel, 2018.
SILVA S. C. C.; TANAMATI F.; VOLTOLINE D. M.; GARCIA A. L. S.;
SCHUROFFE G. P.; GASPARINO E. **Método de extração rápida para DNA de nadadeiras de tilápia do Nilo** **Method for Rapid DNA Extraction from fins of Nile tilapia** **Método de extracción rápida de adn de aletas de tilapia del Nilo**.
JBCA – Jornal Brasileiro de Ciência Animal, 2014. 13, p. 453- 463.