

SWAB BUCAL COMO MÉTODO NÃO INVASIVO PARA OBTENÇÃO DE DNA DE TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)

NATÁLIA CARRILHO BARRETO¹; ADRIANA PINHEIRO DA FRANCA²; HEDEN LUIZ MARQUES MOREIRA²; GABRIELA DA SILVA MARQUES²; HUDSON LIMA DIAS²; RAFAEL ALDRIGHI TAVARES³

¹Universidade Federal de Pelotas – Pelotas, RS. – nataliacbrt@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – Pelotas, RS. – drikafranca13@gmail.com; heden.luiz@gmail.com; huddias96@hotmail.com; gabrielamarques414@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Zootecnia – Pelotas, RS. – r.tavares@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O principal objetivo da aquicultura é maximizar a produtividade do cultivo. Para alcançar uma produção bem-sucedida, é essencial estudar as melhores características expressas pelos indivíduos e adquirir conhecimento sobre as informações genéticas a fim de obter animais mais produtivos (LÁZARO VELASCO, 2017). A extração de DNA é considerada a fonte mais confiável para obter dados genéticos e também possibilita a avaliação da estrutura da população. Atualmente, existem vários protocolos utilizados para realizar esses procedimentos, no entanto, a maioria das coletas de material envolve métodos completamente invasivos, o que causa eventos estressantes para os animais (REINKE *et al.*, 2018; GARCIA, 2017).

Existem diversas maneiras tradicionais de coletar material biológico para a extração de DNA, tais como através da nadadeira caudal, tecido muscular e sangue. Apesar de serem técnicas realizadas com anestesia para evitar desconforto ao animal, é importante ressaltar que esses tecidos danificados podem ser uma porta de entrada para patógenos oportunistas, resultando em doenças e até podendo levar esses animais a morte (TAVARES, 2022). Nos dias de hoje, o bem-estar dos animais de produção é um tema amplamente discutido. Com o avanço da tecnologia, diversas pesquisas têm sido publicadas nessa área, busca-se constantemente alternativas que vão além da simples melhoria e intensificação da produção, mas também visam proporcionar aos animais qualidade de vida e evitar qualquer tipo de sofrimento (GALVÃO, 2022).

Sensível a isso, considerando a relevância da utilização de técnicas eficazes, práticas e não invasivas, o objetivo deste estudo foi investigar a viabilidade de usar a técnica de coleta de swab bucal em substituição a coleta de amostras de tecidos das nadadeiras caudais para a obtenção eficiente da extração de DNA de Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

2. METODOLOGIA

As coletas realizadas foram feitas em 3 animais da espécie Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) oriundos do Laboratório de Ictiologia, localizado na Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – campus Capão do Leão. A fim de testar a eficácia do método utilizando swab bucal em comparação com o método de obtenção de DNA de amostras de nadadeira caudal.

Os animais foram anestesiados e a realização da coleta pelo swab bucal, foi através de raspagem na parte interna da cavidade oral dos animais, usando

pequenas hastes estéreis flexíveis de plástico e algodão nas pontas, conhecidas como swab. Foram feitos movimentos circulares aproximadamente 30 vezes para coletar as células da mucosa bucal. Para a coleta das nadadeiras, foram retiradas uma pequena amostra de aproximadamente 3mm com o auxílio de uma tesoura cirúrgica fina esterilizada. Nas duas metodologias o material biológico foi armazenado em microtubos de 2mL e encaminhadas para o Laboratório de Engenharia Genética Animal – LEGA para então ser realizada a extração de DNA.

Para a extração de DNA dos swabs foi utilizado o protocolo modificado descrito por ABRÃO *et al.* (2005), onde foram adicionados aos microtubos 200µL de uma solução chamada TES (Tris HCl 10mM pH 7,6; EDTA 1mM; SDS 0,6%) e 10µL de proteinase K (10mg/L), posteriormente incubados por 2 horas em banho-maria a 42°C. Após as hastes foram removidas dos microtubos e adicionou-se 42µL de NaCl saturado (6M). Em seguida, as amostras foram centrifugadas em uma centrífuga de bancada por 1 minuto a 15.000 rpm. Após a centrifugação das amostras, os sobrenadantes foram transferidos para um novo tubo estéril, onde foi adicionado o dobro do volume de Etanol Absoluto e as amostras foram centrifugadas novamente, e desprezadas com cuidado para descartar apenas o sobrenadante. Em seguida, foi adicionado 1 mL de Etanol 70% e as amostras foram centrifugadas mais uma vez por 1 minuto a 15.000 rpm. Essa etapa é conhecida como lavagem e foi realizada duas vezes. Após todo o processo, os microtubos foram esvaziados e as amostras foram levadas para a estufa por 30 minutos para a evaporação do Etanol. Após esse procedimento, o DNA foi dissolvido em 30µL de TE 10:0,1 (Tris HCl 10mM; EDTA 0,1mM). Para a extração de DNA de nadadeiras foi utilizado o protocolo descrito por REINKE *et al.* (2018).

Após a extração de DNA, foi realizada à amplificação através da técnica de PCR (Polymerase Chai Reaction), para assim serem visualizados em gel de agarose 2% corado com Gelred corrido por 50 minutos em tampão SB1X. Além disso, as amostras extraídas foram quantificadas em triplicata através do fluorímetro Qubit 3.0 (ThermoFisher, USA) utilizando o dsDNA quantification assay Kit.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações das amostras de DNA analisadas (Tabela 1) apresentaram média de 59,87±23,14 ng/uL, 4,64 ±0,70 ng/uL e 90,60±11,60 ng/uL para extração a partir de swab, nadadeira e marcador molecular (50pb Cellco Brasil) respectivamente.

Tabela 1 – Concentrações de DNA através do fluorímetro Qubit 3.0 (ThermoFisher, USA).

	Swab Bucal			Nadadeira			Marcador
	B1	B2	B3	N1	N2	N3	M
Concentração ng/UL	33,53±1,82	76,93±4,98	69,13±0,44	3,96±1,79	5,36±0,80	4,61±0,72	
Médias ng/uL	59,87±23,14			4,64±0,70			90,60±11,60

Para confirmação da qualidade das extrações de swab as amostras foram submetidas à amplificação por PCR utilizando a sequência parcial do gene MC1R de tilápia (NC_031965.2) (Figura 1).

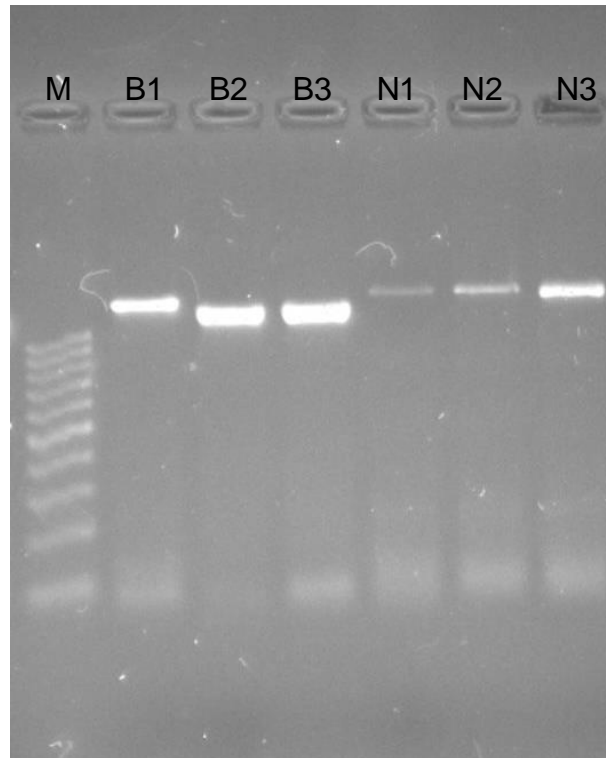


Figura 1 – Amplificação parcial do gene MC1R de Tilápia-do-Nilo. Gel de agarose 2% em tampão SB1X corado com Gelred e fotografado em luz UV. M: marcador de peso molecular; B: swab bucal; N: nadadeira caudal.

Sabe-se que as amostras extraídas através das nadadeiras caudal apresentariam resultados positivos, pois esta é uma técnica comumente executada, pois proporciona alta viabilidade para extração com pequenas quantidades de material biológico, além de apresentar qualidade na amplificação do DNA (DA SILVA *et al.*, 2014). Entretanto, as amostras coletadas através do swab também apresentaram resultados satisfatórios quando aplicadas ao gel de agarose e na quantificação.

Há sempre a busca de novas tecnologias afim de melhorar o bem-estar e a qualidade de vida dos animais, com isso técnicas não invasivas têm sido amplamente discutidas e testadas. GARCIA (2017) encontrou resultados satisfatórios ao testar o método não invasivo de coleta de material biológico para preguiças *Bradypus tridactylus*, destacando o baixo custo e a agilidade no manejo dos animais durante a coleta, sendo uma alternativa viável para amplificação do DNA extraído.

ALMEIDA *et al.* (2020), destacou a importância de buscas técnicas eficazes e não invasivas para a obtenção de DNA, e que, principalmente evite a eutanásia de animais. Sendo assim, a mesma e seus colaboradores utilizaram a técnica de swab bucal em substituição ao uso de amostras de tecidos de duas espécies de anuros: *Dendropsophus nanus* e *Scinax fuscovarius*, concluindo que não há a necessidade da coleta de amostras de tecidos obtidos a partir da eutanásia dos animais, visto que os resultados não demonstraram diferença na eficiência.

É justo destacar que os avanços científicos dificilmente seriam alcançados sem a utilização de modelos animais, os tornando essenciais para o desenvolvimento das pesquisas e conseqüentemente da ciência. Dito isso, a busca por novas técnicas a serem usadas com os animais, a fim de garantir e respeitar o seu bem-estar, devem ser constantes (DE SÁ RODRIGUES *et al.*, 2021).

4. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados no presente estudo demonstram a eficiência do método de coleta de material biológico através do swab bucal para extração de DNA de Tilápia-do-Nilo, podendo ser uma metodologia a ser utilizada visando a praticidade e principalmente o bem-estar dos animais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRÃO, Milena Garcia et al. Padronização da técnica de extração de DNA de células de mucosa oral com NaCl: aplicação no estudo do gene PROP1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, p. 978-982, 2005.

DA SILVA, S. C. C. et al. Método de extração rápida para DNA de nadadeiras de Tilápia-do-Nilo. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**. São Paulo, v.7 n.13, p. 453-463, 2014.

DE ALMEIDA, Lara Micheletti et al. Swab bucal em anuros: uma proposta de substituição ao uso de métodos invasivos para obtenção de dna animal em pesquisa. **Revista Brasileira de Desenvolvimento**, v. 6, n. 7, pág. 54064-54072, 2020.

DE SÁ RODRIGUES, R. P. *et al.* Bem-estar animal na pesquisa científica–Revisão de literatura/Animal welfare in scientific research-Review of literature. **Jornal Interdisciplinar de Biociências**, v. 6, n. 1, p. 30-34, 2021.

GALVÃO, J. A. **BIOSEGURANÇA E SANIDADE NA AQUICULTURA: ONDE ESTAMOS E ONDE QUEREMOS CHEGAR? 2022**. Aquaculture Brasil, 24 Jan 2022. Coluna. Acessado em 31 Ago. 2023. Online. Disponível em: <https://www.aquaculturebrasil.com/coluna/220/biosecuranca-e-sanidade-na-aquicultura:-onde-estamos-e-onde-queremos-chegar>

GARCIA, E. H. S. De P. **Extração não Invasiva de Dna de Duas Espécies de Preguiças, *Bradypus tridactylus* e *Bradypus variegatus*: uma avaliação de métodos**. 2017. Repositório do INPA, 04 Dez. 2017. Relatório. Acessado em 30 de Ago. 2013. Disponível em: <https://repositorio.inpa.gov.br/handle/1/37906>

LÁZARO VELASCO, Á. de J. **Ferramentas de seleção para uniformidade de produção em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2017. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

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.

TAVARES, G. C. **DOENÇAS PARASITÁRIAS EM PEIXES DE PRODUÇÃO. CADERNOS TÉCNICOS DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA (Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG)**, Belo Horizonte-MG, n.101, p. 154-166, 2022.