

OTIMIZAÇÃO DE ARMS-PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÃO NO GENE GRELIN ASSOCIADO COM O CRESCIMENTO DE TILÁPIA-DO-NILO

NATÁLIA CARRILHO BARRETO¹; HEDEN LUIZ MARQUES MOREIRA²;
HUDSON LIMA DIAS² VITÓRIA CARRILHO BARRETO; ADRIANA PINHEIRO DA
FRANCA; RAFAEL ALDRIGHI TAVARES³

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

² Universidade Federal de Pelotas, RS – heden.l Luiz@gmail.com; hddias96@gmail.com;
vcarrilho05@gmail.com; drikafranca13@gmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura tem desempenhado um papel crescente na produção sustentável de alimentos (STANKUS, 2021), sendo a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) uma espécie de interesse econômico e no âmbito científico, devido a busca por tecnologias elaboradas afim de melhorar seu desempenho produtivo e elevar ainda mais a produção (DA SILVA et al., 2022; IGARASHI, 2024). Justamente por suas características de crescimento rápido e fácil manejo de criação, tornando-se a espécie mais popular no mundo atualmente (XIMENES; VIDAL, 2023).

O gene da Grelina é responsável pela produção do hormônio grelina, que é um peptídeo de 28 aminoácidos produzidos principalmente pelas células endócrinas das glândulas gástricas no estômago, este regula o apetite e possui a importante função no controle do crescimento e metabolismo dos animais (VOLKOFF, 2016). A elevação dos níveis plasmáticos de grelina ocorre, em sua maioria, antes das refeições ou em situações de restrição alimentar, resultando no estímulo do consumo. Logo após a ingestão do alimento, impulsionada pelo aumento dos níveis de grelina no plasma, há uma redução no gasto energético e um incremento nas reservas de energia (ZHONG et al., 2023; KOWALSKI et al., 2014).

Recentemente, avanços nas técnicas moleculares possibilitam a identificação de variações genéticas associadas ao desempenho e crescimento dos animais. A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do sistema de amplificação refratária de *tetra-primer* (ARMS) mostra-se como uma ferramenta eficaz na identificação de polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) no genoma, possibilitando a distinção precisa entre os alelos, isto porque, envolve apenas uma única realização de PCR seguido de eletroforese em gel (AHLAWAT et al., 2014; ANTONINI; MENECHIN; URASHIMA, 2004). Esta técnica utiliza *primers* externos e internos, sendo que os externos amplificam um grande fragmento do gene alvo, sem diferir os genótipos, e cada *primer* interno combina-se com um dos *primers* externos para gerar fragmentos menores e específicos, de acordo com o alelo presente (LI et al., 2014)

O presente estudo tem como objetivo a otimização da técnica de ARMS-PCR para a identificação de mutações no gene Grelina em populações de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), através da técnica *tetra-primer* ARMS-PCR.

2. METODOLOGIA

Foram utilizadas sete amostras de DNA de tilápias-do-Nilo já extraídas e pertencentes ao Laboratório de Engenharia Genética Animal (LEGA) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Foram desenhados, com o software XXXXX, quatro *primers* (Tabela 1), dois externos (*outer primers*) que funcionam como o controle positivo da reação de PCR e dois internos (*inner primers*) que se ligam na região específica da mutação do tipo SNP (C/T) do gene da grelina

Tabela 1. Sequência de *primers* utilizado para a diferenciação dos alelos da grelina.

Forward	Sequência 5'-3'	Reverse	Sequência 5'-3'	Tamanho (pb)
ONGRLN_F O	CTATGAGCCAAGCCT TCTCATTAAC	ONGRLN_RO	TCTGCTGGCACCTA TAAATATATCAATAT	274
ONGRLN_FI	CTAAACCTGTGGAAA GCTAAAAGAAATTAC	ONGRLN_RO	TCTGCTGGCACCTA TAAATATATCAATAT	185
ONGRLN_F O	CTATGAGCCAAGCCT TCTCATTAAC	ONGRLN_RI	TAAGATAATACTGG CCCATGCTTATCA	146

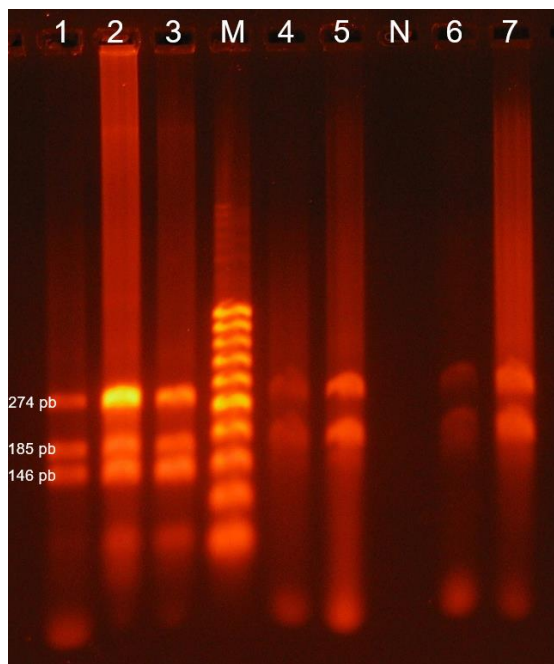
ONGRLN_FI: *Forward inner*; ONGRLN_RI: *Reverse inner*; ONGRLN_RO: *Reverse outer*; ONGRLN_FO: *Forward outer*.

As reações de PCR foram padronizadas com base no protocolo de MEDRANO; OLIVEIRA (2014), contendo 1 µL de DNA, 0,5 µL de cada *primer* interno e externo, 0,5 mM de dNTP, 0,3 µL de Taq-DNA-polimerase (5 U/µL) e 2,5 µL de tampão 10 X concentrado (tris-HCl 10 mM, KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM). As amostras foram submetidas a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 20 s, anelamento a 56,5°C por 20 s, extensão a 72°C por 35 s e por fim extensão final a 72°C por 10 minutos. Após a amplificação do DNA, os fragmentos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2% com 50 minutos de corrida a 150 volts corado com solução de fluorescência *GelRed* em tampão SB1X.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de *tetra-primer* ARMS-PCR foi eficientemente otimizada para determinar a mutação no gene da Grelina, visto que, para sua visualização no gel de agarose a 2% foi eficaz (Figura 1). Este protocolo requer medidas de otimização mais extensas, como temperatura de anelamento, proporções de *primers*, qualidade do DNA, assim como, concentrações de dNTP e Taq DNA polimerase (MEDRANO; DE OLIVEIRA, 2014).

Figura 1 – Foto gel de agarose a 2% mostrando o resultado do PCR pela técnica de *tetra-primer* ARMS-PCR para o gene da Grelina em tilápias-do-Nilo.



N: negativo; M: marcador (50pb); 1 a 7: Amostras.

Através da visualização do gel de agarose (Figura 1), pode-se observar, nas amostras 1, 2 e 3, a presença dos padrões dos fragmentos de três bandas, onde o fragmento de 274 pb é referente a amplificação dos *primers* externos (controle positivo), o fragmento de 185 é determinado pelo SNP C e o fragmento de 146 pb pelo SNP T, identificando os indivíduos como heterozigotos (C/T). Já nas amostras 4, 5, 6 e 7 a presença de dois fragmentos, sendo o controle positivo e a banda do SNP C, portanto, distinguindo das amostras 1 a 3, sendo homozigotos (C/C).

CHEN et al., (2020) em seu estudo, investigaram polimorfismo de sequência única em tilápias-do-Nilo e destacaram que a grelina está intimamente associada as características de crescimento visto que a mesma está relacionada a ingestão de alimentos, além de considerar o papel regulador dos genes ligados ao apetite, melhorando o desempenho dos animais.

4. CONCLUSÕES

A técnica de otimização através ARMS-PCR para a identificação de mutações do tipo SNP (C/T) no gene da Grelina em populações de tilápias atendeu às expectativas da pesquisa, demonstrando que a técnica é eficaz. Ainda se destaca que esta técnica fornecerá dados genéticos para futuros métodos de melhoramento, a fim de melhorar o desempenho dos animais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONINI, S. R. C.; MENEGHIN, S. P.; URASHIMA, A. S. Técnicas básicas de biologia molecular. **Araras: Centro de Ciências Agrárias/UFSC**, 2004.

CHEN, B. et al. Ghrelin gene single nucleotide polymorphisms and their effects on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth. **Aquaculture Reports**, v. 18, p. 100469, 2020.

DA SILVA, A. A. N *et al.* Tilápia, um olhar econômico, nutricional e gastronômico – relato de experiência interdisciplinar. **Foco em Saúde**, Registro/SP, edição nº 14, p. 50 - 64, 2022.

IGARASHI, M. A. Desenvolvimento tecnológico e econômico do cultivo de tilápias em tanque-redes e viveiros escavados no Brasil. **Nutri Time**, Viçosa, v.21, n.3, p. 9.357 – 9.375, 2024.

KOWALSKI, L. H. *et al.* Leptina e grelina na produção de ruminantes. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 375-383, 2014.

MEDRANO R.F.; DE OLIVEIRA C.A. Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development. **Mol Biotechnol.** 2014. n, 56 (7), p.599-608. doi: 10.1007/s12033-014-9734-4.

STANKUS, A. Estado da aquicultura mundial 2020 e revisões regionais: série de webinars da FAO. **Boletim informativo sobre aquicultura da FAO**, n. 63, p. 17-18, 2021.

VOLKOFF, Helene. The Neuroendocrine Regulation of Food Intake in Fish: a review of current knowledge. **Frontiers In Neuroscience**, [S.L.], v. 10, n. -, p. 10-31, 29 nov. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2016.00540>.

XIMENES, L. F.; VIDAL, M. De F. Pesca e Aquicultura: Piscicultura. 2023. Fortaleza: BNB, ano 8, n.272, mar. 2023. (**Caderno Setorial Etene**).

ZHONG, Huan *et al.* Nonadditive and allele-specific expression of ghrelin in hybrid tilapia. **Frontiers In Endocrinology**, [S.L.], v. 14, n. -, p. 01-10, 13 dez. 2023. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2023.1292730>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/endocrinology/articles/10.3389/fendo.2023.1292730/full>. Acesso em: 19 set. 2024.