

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS - CAMPUS BAURU
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Natalia dos Santos

**AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR LOOP PARA IDENTIFICAÇÃO DE
ESPÉCIES PURAS E HÍBRIDOS DE PEIXE DA FAMÍLIA SERRASALMIDAE
UTILIZADOS NA PISCICULTURA BRASILEIRA**

BAURU – 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS - CAMPUS BAURU
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Natalia dos Santos

**AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR LOOP PARA IDENTIFICAÇÃO DE
ESPÉCIES PURAS E HÍBRIDOS DE PEIXE DA FAMÍLIA SERRASALMIDAE
UTILIZADOS NA PISCICULTURA BRASILEIRA**

Trabalho de conclusão de Curso apresentado à
Universidade Estadual Paulista (UNESP), como parte das
exigências para a obtenção do título de bacharel em
Ciência Biológicas.

Orientador: Prof. Assoc. Fábio Porto-Foresti

BAURU – 2022

S237a

Santos, Natalia dos

Amplificação isotérmica mediada por loop para identificação de espécies puras e híbridos de peixe da família Serrassalmidae utilizados na piscicultura brasileira / Natalia dos Santos. -- Bauru, 2022

50 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências, Bauru
Orientador: Fábio Porto Foresti

1. análise genética. 2. peixes redondos. 3. conservação. 4. LAMP. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências, Bauru. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



Laboratório de
Genética de Peixes
Unesp Bauri

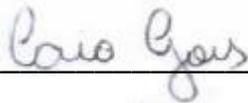


BANCA EXAMINADORA



Prof. Assoc. Fábio Porto-Foresti

(Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências, Bauru, SP)



Mestre Caio Augusto Gomes Goes

(Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências, Bauru, SP)



Mestre Caio Felipe da Silva

(Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências, Bauru, SP)

*Dedico este trabalho à minha família,
namorado (Massao), Erina Kodama e João Dourado
pelo apoio e por acreditarem em mim sempre.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço às instituições e pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho e da minha formação como aluna e profissional, em particular: Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio concedido.

A Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista, campus Bauru e ao departamento de Ciências Biológicas, pelas oportunidades oferecidas que contribuíram para minha formação acadêmica.

Ao Laboratório de Genética de Peixes (LAGENPE) pela oportunidade de realizar este trabalho e a todos no laboratório que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

Ao Professor Fábio Porto-Foresti, pelas oportunidades e pelo apoio oferecido.

Aos amigos do LAGENPE: Caio G., Caio F., Caroline M., Henrique, Ricardo U., Rodrigo M., Rodrigo Z., Gabriela I., Raíssa, R., Yasmin G. Ana Luiza L., que sempre estiveram presentes e dispostos a ajudar e que me acolheram de braços abertos.

Aos amigos de graduação, Chelsea M., Eleonora M., Henrique Heidi H., Laura C., Matheus Barbosa e Thalissa Y. pela amizade e companheirismo durante todos esses anos e em especial à Ana Luiza C. Lein, minha parceira do laboratório que sempre me acompanhou e ajudou em todos os momentos, compartilhando momentos inesquecíveis durante esse processo.

Ao meu namorado, Massao que sempre esteve presente e que sempre me apoiou dentro e fora da universidade. Obrigado pelo amor, carinho, apoio e por acreditar em mim sempre, sem você nada disso seria possível!

A Erina Kodama e João Dourado que sempre me incentivaram, me apoiaram com todas as forças e por se tornarem minha segunda família. Meus mais sinceros agradecimentos por todo apoio que me ofereceram!

A minha família, meus pais, Arnaldo e Francisca pelo amor e apoio ao longo de todos esses anos e meu irmão, Gustavo, pelo apoio e compreensão ao longo desses anos. Obrigado por todo o esforço e dedicação para que este momento fosse possível!

“The creation of a single world comes from a huge number of fragments and chaos” -

Miyazaki, Hayao.

RESUMO

A amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) é uma técnica molecular e tem sido amplamente utilizada em diversos campos biológicos, devido à facilidade com que pode ser aplicada na identificação de espécies. O desenho de *primers core* e *loop* para a utilização da técnica de amplificação é mais complexo do que *primers* para PCR (*Polymerase chain reaction*), pois são quatro *primers core* e dois *loop* específicos que reconhecem seis sequências distintas do DNA alvo para a amplificação, em contraste com apenas dois da PCR normal. Entretanto, essa técnica possibilita a identificação de espécies de forma rápida, precisa e de baixo custo quando comparada à PCR. Na aquicultura, a identificação de espécies parentais e seus respectivos híbridos através da LAMP permite o diagnóstico e análises objetivas que podem ser utilizadas no manejo correto dentro das pisciculturas, na identificação das espécies no início do cultivo, além de permitir o aumento do conhecimento acerca das espécies cultivadas que podem gerar impactos no meio ambiente, afetando as populações selvagens. O objetivo do trabalho foi aplicar e padronizar a técnica LAMP para a identificação de espécies puras de *Colossoma macropomum*, *Piaractus mesopotamicus* e seu híbrido (“tambacu”) e com isso possibilitar análises mais rápidas, precisas, eficientes e de baixo custo e com visualização rápida, simples e objetiva. No presente trabalho foi possível elaborar pela primeira vez um protocolo de LAMP para diagnóstico das espécies *P. mesopotamicus* e *C. macropomum*, assim como para o tambacu, utilizando o gene RAG2. Com os resultados dos produtos de amplificação, foi possível a validação da técnica LAMP para a identificação das espécies dos peixes em questão, diagnosticando e diferenciando indivíduos puros e híbridos.

Palavras-chave: análise genética; peixes redondos, conservação, LAMP.

ABSTRACT

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a molecular technique that has been widely used in several biological fields, due to the ease of application in species identification. The design of core and loop primers for using the amplification technique is more complex than PCR primers, as there are four core primers and two loop specific that recognize six distinct sequences of the target DNA for amplification, in contrast with only two of the normal PCR. However, this technique makes it possible to identify species quickly, accurately and at lower cost when compared to PCR. In aquaculture, the identification of parental species and their respective hybrids through LAMP allows the diagnosis and objective analysis that can be used to adequately manage fish farms, in the identification of species at the beginning of the cultivation, and allows increased knowledge regarding impacts environment impacts caused by cultivated species, affecting wild populations. The objective of this work was to apply and standardize the LAMP technique for the identification of pure species of *Colossoma macropomum*, *Piaractus mesopotamicus* and its hybrid ("tambacu"), thus enabling faster, more accurate, efficient and low-cost analysis, with quick visualization, in a simple and objective manner. It was possible to develop for the first time a LAMP protocol for the diagnosis of *P. mesopotamicus* and *C. macropomum* species, as well as for tambacu, using the RAG2 gene. It was also possible to validate the LAMP technique to identify the species of the fish in question, diagnosing and differentiating pure and hybrid individuals.

Keywords: genetic analysis; round fishes, conservation, LAMP.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS.....	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4. RESULTADOS	27
5 DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÃO	43
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1 INTRODUÇÃO

Na piscicultura de água doce no Brasil, a produção de juvenis (peixes jovens) voltados para o comércio, apenas se estabeleceu em torno de 1990, o que gerou grandes mudanças na demanda para consumo. A procura por espécies com características mais favoráveis aumentou, o que levou a busca pela melhoria na piscicultura no país, incluindo a utilização de programas de melhoramento genético (HASHIMOTO et al., 2011a). Dessa forma, a utilização de métodos para melhoramento genético, a partir da década de 1980, contribuiu para os cultivos de peixes, onde a maioria das linhagens de peixes geneticamente melhoradas dentro da indústria foram desenvolvidas por meio de métodos clássicos de manipulação genética, incluindo a hibridação, seleção e endogamia, sendo a hibridação um dos métodos mais usados no mundo e no Brasil (HASHIMOTO et al., 2011a, 2012; SATO, 2015).

A piscicultura brasileira vem se destacando cada vez mais, com crescimento de 5,93% em 2020 e com cerca de 802.930 toneladas produzidas (MACIEL et al., 2021). Segundo Maciel et al. (2021) entre 2013 e 2016, as espécies de peixes mais cultivadas no Brasil incluem o *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816), com cerca de 74%, o tambacu (híbridos entre *C. macropomum* e *P. mesopotamicus*) e tambatinga (híbridos entre *C. macropomum* e *Piaractus brachypomus*), aproximadamente 3 % e *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) e patinga (híbridos entre *P. mesopotamicus* e *P. brachypomus*) com cerca de 2%. Ainda, segundo Aguiar (2012) o recente aumento da produção na aquicultura brasileira pode ser atribuída ao cultivo de peixes como o tambaqui (*Colossoma macropomum*) e o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) incluindo seus híbridos (tambacu e paqui) obtidos pelo cruzamento entre essas espécies que são amplamente aceitos pelo

comércio e produzidos praticamente por todo o país. No Brasil, o cultivo dessas espécies representa a maior parte de espécies nativas produzidas na aquicultura, o que se tornou uma alternativa para as demandas do mercado e para a redução de impactos em populações naturais gerados pelo comércio de peixes (HASHIMOTO et al., 2011b , MACIEL, 2022).

A família Serrasalminidae inclui 101 espécies e 16 gêneros, pertence à Ordem Characiformes, Classe Actinopterygii, e Filo Chordata, além disso, são distribuídos estritamente em áreas neotropicais ao longo dos principais rios na América do Sul (AGUIAR, 2012; FAVARATO, 2019; MASTROCHIRICO-FILHO et al., 2021). Embora seja monofilética, é dividida em três grandes clados (“pacus”, “Myleus” e “piranha”), apresentando alta diversidade morfológica e cromossômica e, dentro dos Serraselmídeos, encontram-se o *Piaractus mesopotamicus* (conhecido popularmente como pacu) e o *Colossoma macropomum* (conhecido como tambaqui) que são espécies de grande relevância econômica devido à sua qualidade como alimento (FAVARATO, 2019).

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é uma espécie Neotropical de extrema importância cultivada no Brasil e se encontra distribuído ao longo das bacias dos rios Paraná, Paraguai e Prata, ocorrendo principalmente nas planícies alagadas do Pantanal, entretanto, seus estoques de populações selvagens vêm apresentando diminuição ao longo dos últimos anos em decorrência da sobrepesca e das alterações ambientais em seu habitat (MASTROCHIRICO-FILHO, 2016). Diversos estudos genéticos acerca dessa espécie foram realizados nos últimos anos (HASHIMOTO et al., 2011a; MASTROCHIRICO-FILHO, 2016; MARTINS, 2017) evidenciando a importância dos estudos sobre a espécie tanto no ambiente selvagem quanto em cultivos, principalmente devido a sua importância na aquicultura e também pela diminuição de populações selvagens (AGUIAR, 2012).

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é considerado o segundo maior peixe de escamas da Bacia Amazônica, ocorrendo apenas na América do Sul, atingindo cerca de 100 centímetros de comprimento e pesando até 30 kg, sendo encontrado nos Rios Solimões-Amazonas, Orinoco, assim como em seus afluentes (AGUIAR, 2012; Val & OLIVEIRA, 2021; HILSDORF et al., 2021). Esta espécie consegue resistir a baixas concentrações de oxigênio, vive em locais ricos em nutrientes (possui hábito alimentar muito amplo) e com temperaturas entre 25°C e 34°C (AGUIAR, 2012; MACIEL, 2021). Além disso, apresenta uma coloração preta na região dorsal e entre amarelo e verde oliva na região ventral, entretanto, a coloração pode ser afetada pela transparência da água dependendo do local no qual se encontra (AGUIAR, 2012). Os híbridos de tambaqui apresentam grande semelhança às espécies parentais, assim, os indivíduos cultivados podem apresentar riscos para populações nativas, devido a diferença de genes em relação às populações selvagens, e de cativeiro devido a baixa diversidade genética (AGUIAR, 2012).

Entre os híbridos que envolvem as duas espécies citadas, o que possui maior relevância comercial é o “tambacu”, obtido a partir do cruzamento entre fêmea de *C. macropomum* e macho de *P. mesopotamicus*, que se popularizou no Brasil pelas características favoráveis das duas espécies combinadas, como a robustez, a resistência às baixas temperaturas e o crescimento rápido (HASHIMOTO et al., 2011a, de PAULA et al., 2021). A hibridação é feita a partir do cruzamento de indivíduos ou de grupos geneticamente distintos, ocorrendo dentro de uma mesma espécie ou entre espécies diferentes, na qual esta última é chamada de hibridação interespecífica e que pode ocorrer naturalmente ou induzida por humanos, ocorrendo em cerca de 6 a 10% das espécies na natureza e sendo comum em peixes de água doce. Além disso, são utilizadas para obter melhores características voltadas à piscicultura (HASHIMOTO et al., 2011a; LIMA et al., 2019). A

hibridação interespecífica, por exemplo, é uma prática comum em pisciculturas no Brasil em busca de características zootécnicas favoráveis à produção (HASHIMOTO et al., 2011b; MARTINS, 2017; PRADO et al., 2017) e que são desenvolvidas por métodos clássicos de manipulação genética, incluindo a hibridação e endogamia, onde a hibridação é amplamente utilizada em pisciculturas (HASHIMOTO et al., 2011b; MARTINS, 2017).

A hibridação em peixes é muito comum devido às características deste grupo, como a fertilização externa e a abundância de espécies e também pode ser atribuída à intervenção humana, através da aquicultura e da introdução de espécies em locais diferentes do de origem, assim como as alterações de hábitat (HASHIMOTO et al., 2011a; LIMA et al., 2019).

Figura 1: Representante de peixe da espécie popularmente chamada de Pacu - *Piaractus mesopotamicus*. Fonte: Klima Naturali (2011).



Figura 2: Representante de peixe da espécie popularmente chamada de tambaqui - *Colossoma macropomum*. Fonte: Portal amazônia (2021).



Figura 3: Representante de híbrido entre as espécies pacu (macho) e tambaqui (fêmea), popularmente chamada de tambacu. Fonte: Portal amazônia (2021)



Cruzamentos entre pacu e tambaqui são comumente realizados devido à taxa de crescimento rápido, resistência a baixas temperaturas e a melhor qualidade da carne em relação às espécies parentais. Alguns locais no Brasil apresentam taxa de produção do "tambacu" em cerca de 8359 toneladas, enquanto que as espécies puras de pacu e tambaqui alcança cerca de 7953 e 6645 toneladas respectivamente (HASHIMOTO, 2011a; FANTINATTI et al, 2021).

A presença de indivíduos híbridos em estoques reprodutores já foi verificada para diversos grupos, em várias localidades, dentre eles, os peixes redondos e bagres no Brasil (HASHIMOTO et al., 2016). Segundo Martins (2017), apesar dos possíveis ganhos através da hibridação interespecífica artificial, alguns problemas graves podem surgir pelo manejo incorreto e execuções indevidas nos projetos de cultivo devido a semelhança dos híbridos os indivíduos parentais puros, que pode gerar misturas e comprometer a integridade e desempenho do cultivo, principalmente devido a possibilidade de espécimes férteis reproduzirem com seus parentais, levando à contaminação e introgressão genética, que por sua vez, pode ser responsável pela perda de características desejáveis à produção, além intensificar eventos como a extinção genética e contribuir para o aumento da taxa de mortalidade das linhagens produzidas (MIA et al., 2005; HASHIMOTO et al., 2013; PRADO et al., 2014; MARTINS, 2017).

Além de representar riscos para a produtividade, também há a possibilidade de gerar impactos no ambiente pela introdução desses híbridos em estoques selvagens. Isso pode ocorrer pelo esvaziamento dos tanques de produção, além dos chamados "pesque-pague" que são um dos principais responsáveis pela introdução de espécies exóticas em ambientes

selvagens (HASHIMOTO et al., 2011b, 2012; PRADO et al, 2014), sendo difícil prever os impactos causados pela introdução desses híbridos (MARTINS, 2017). Essa problemática representa uma ameaça para a conservação de espécies nativas por fatores como: a competição por espaço e recursos (que se intensifica), a predação por parte dos híbridos (que pode causar a redução de populações nativas de presas) e restrições em locais de desova (SATO, 2015).

A fim de monitorar as espécies de peixes produzidas em aquiculturas no Brasil, é extremamente importante o uso de metodologias acessíveis na identificação de espécies híbridas e parentais. A precisão na identificação de híbridos é de grande importância a fim de promover o desenvolvimento sustentável dentro da aquicultura e para avaliações dos indivíduos produzidos, assim como para compreender melhor as relações com a biodiversidade (HASHIMOTO, 2012). Portanto, faz-se necessário o uso de análises genéticas para avaliar esses organismos, sendo fundamental a identificação correta das espécies comercializadas para o manejo correto dentro das pisciculturas, da mesma forma que possibilita aumentar o conhecimento acerca dos impactos causados no ambiente que afetam as populações selvagens (AGUIAR, 2012; PRADO et al., 2014; MARTINS, 2017). A utilização de estudos genéticos permitem a realização do manejo adequado voltado tanto para a conservação de estoques selvagens, como também para melhorias na produção dentro da aquicultura, proporcionando uma melhor compreensão das espécies em si e da ocorrência de híbridos tanto em cultivo quanto em estoques naturais (AGUIAR, 2012; SATO, 2015).

Além disso, a identificação de espécies de peixes comercializadas também vem recebendo mais atenção internacionalmente devido à possibilidade de adulterações em produtos, visto que espécies ameaçadas podem ser vendidas como espécies

morfologicamente similares e podem causar perdas à biodiversidade (XIONG et al., 2021), sendo difícil identificar as espécies, especialmente em carnes já processadas. Dessa maneira, a identificação baseada através da morfologia externa pode levar a resultados incorretos (XIONG et al., 2020; LIMA et al., 2019;) principalmente nos casos envolvendo juvenis de *C. macropomum* e *P. mesopotamicus* (HASHIMOTO, 2012).

Diversos métodos já foram propostos para a identificação de peixes híbridos, como por exemplo o uso de técnicas como a reação em cadeia da polimerase (PCR). Um dos métodos amplamente utilizado para identificação de espécies é através do uso de marcadores moleculares em conjunto com a PCR, que auxiliam na detecção de espécies puras e híbridas, permitindo compreender os eventos biológicos tanto em cultivos quanto no ambiente natural (LIMA et al., 2019). Assim, os marcadores moleculares diagnósticos de espécies são fundamentais na identificação de grupos que apresentam caracteres morfológicos sobrepostos, sendo amplamente utilizados para pesquisas envolvendo híbridos (SRIPHAIROJ et al., 2018; HASHIMOTO, 2012). Adicionalmente, métodos como a PCR-RFLP e PCR multiplex já foram bem estabelecidos para a identificação de híbridos em espécies híbridas de serraselmídeos (HASHIMOTO, 2012).

A técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR), permite a produção e detecção de grandes quantidades de DNA provenientes de diferentes tipos de tecidos, através do uso de amostras, reagentes específicos e uma fonte de calor (MULLIS, 1990), onde pequenas quantidades de DNA são necessárias para gerar cópias suficientes para análises laboratoriais e, por isso, a PCR é um método específico (GARIBYAN & AVASHIA 2013).

A PCR utiliza ciclos de temperatura para iniciar e terminar a amplificação do DNA catalisada por enzimas, consistindo em 3 estágios distintos: a desnaturação da fita de DNA com calor (geralmente acima de 90°C), o anelamento dos *primers* específicos previamente

desenhados que são complementares à fita desnaturada e, por fim, a extensão, uma reação enzimática que ocorre entre 55°C e 70°C catalisada por uma DNA polimerase termoestável, onde o início da síntese de DNA ocorre na extremidade 3' de cada *primers* que foi ligado (GREEN & SAMBROOK, 2019).

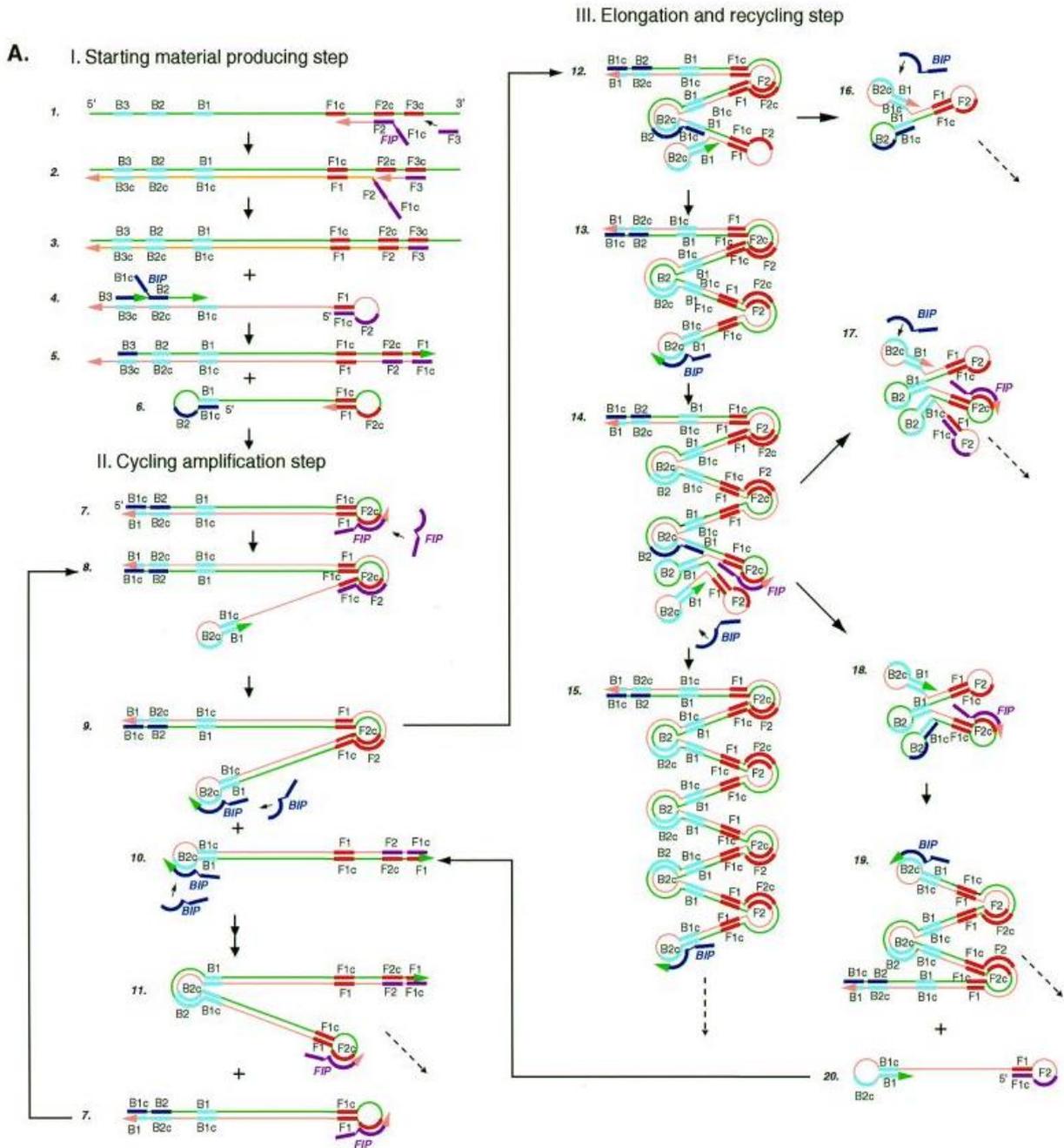
A PCR é amplamente empregada para identificar diferentes espécies, tendo eficácia já estabelecida, sendo que para a aplicação da PCR, é necessário a extração de DNA dos espécimes, seguida da amplificação genética, que demanda infraestrutura adequada, fazendo com que seu uso seja, em partes, restrito (NOTOMI, 2015; XIONG et al., 2021), visto que demanda equipamentos caros e muito tempo para sua realização, podendo se tornar um obstáculo em alguns estudos (LI et al., 2017; XIONG et al., 2020).

Alternativamente, nas últimas duas décadas, a LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*) vem se tornando uma importante ferramenta para diagnósticos genéticos, não se limitando apenas ao uso clínico, mas também sendo utilizada no controle da qualidade de alimentos e no monitoramento ambiental (BECHERER et al. 2020).

A técnica de LAMP foi inicialmente desenvolvida por NOTOMI e colaboradores em 2000 como uma nova técnica molecular para um diagnóstico mais simples e econômico, amplificando os fragmentos de DNA com alta especificidade, rapidez e eficiência em condições isotérmicas. Em comparação com a PCR, a LAMP apresenta baixos custos, não necessita de equipamentos específicos (visto que não precisa de ciclagem controlada de temperatura) e seus resultados podem ser visualizados a olho nu através da fluorescência (LI et al., 2017; CHAOUCH, 2021; XIONG et al., 2020; XIONG et al., 2021). Sendo assim, pode ser implementada em campo, nas pisciculturas ou em ambientes com recursos limitados, visto que demanda de uma infraestrutura simplificada em relação a PCR, não exigindo termocicladores, e dessa forma, facilitando seu uso e permitindo uma rápida detecção de

espécies puras e híbridas em um curto espaço de tempo (CHAOUCH, 2021; XIONG, et al., 2021).

Figura 5: Representação da reação de LAMP com a ligação dos *primers* em temperatura constante. Fonte: Notomi et al, (2000)



A técnica consiste em três etapas principais, sendo a primeira a produção inicial do alvo, seguido pela ciclagem e amplificação e por último o alongamento e reciclagem. Utiliza-se uma DNA polimerase de *Bacillus stearothermophilus* (Bst), quatro *primers* no total (chamados de *core*), sendo dois *primers* internos (FIP e BIP) e dois externos (F3 e B3) que são desenhados especificamente para fazer a reação e que são capazes de reconhecer seis

regiões distintas no DNA alvo (NOTOMI et al, 2000; NAGAMINE et al, 2002). Cada um dos *primers* internos é complementar a uma região da fita de amplificação na porção final da 3' e idêntica a região interna da mesma fita na porção terminal 5'. Primeiramente, uma estrutura de DNA *loop* é construída, possuindo sequências das duas extremidades do DNA que são obtidas a partir do *primer* interno.

Secundariamente, um *primer* interno se encaixa no *loop* obtido no primeiro ciclo e começa a síntese de DNA que, conseqüentemente, desloca a fita de DNA original e produzindo um novo DNA no *loop* cujo tamanho passa a ser duas vezes maior. Dessa forma, o processo de alongamento é repetido sequencialmente através do deslocamento da fita mediada pela DNA polimerase, através dos *loops*. Como não ocorre o passo inicial de desnaturação da fita como ocorre na PCR, a Bst realiza a desnaturação juntamente com a formação de outra fita, sem a necessidade de alteração da temperatura durante o processo (NOTOMI et al, 2000; CHAOUCH, 2021; XIONG et al, 2020; XIONG et al, 2021). Assim, ao final da reação, as fitas de DNA serão encontradas com várias repetições em *loop*, amplificando o DNA em 10^9 cópias do alvo, que ocorre em menos de uma hora (NAGAMINE et al., 2002). As características dos *primers* internos faz com que a reação apresente alta especificidade mesmo quando comparada a outros métodos (NOTOMI et al, 2015). Entretanto, o design correto dos *primers* específicos para a reação é a única limitação para aplicação desta técnica (XIONG et al, 2020).

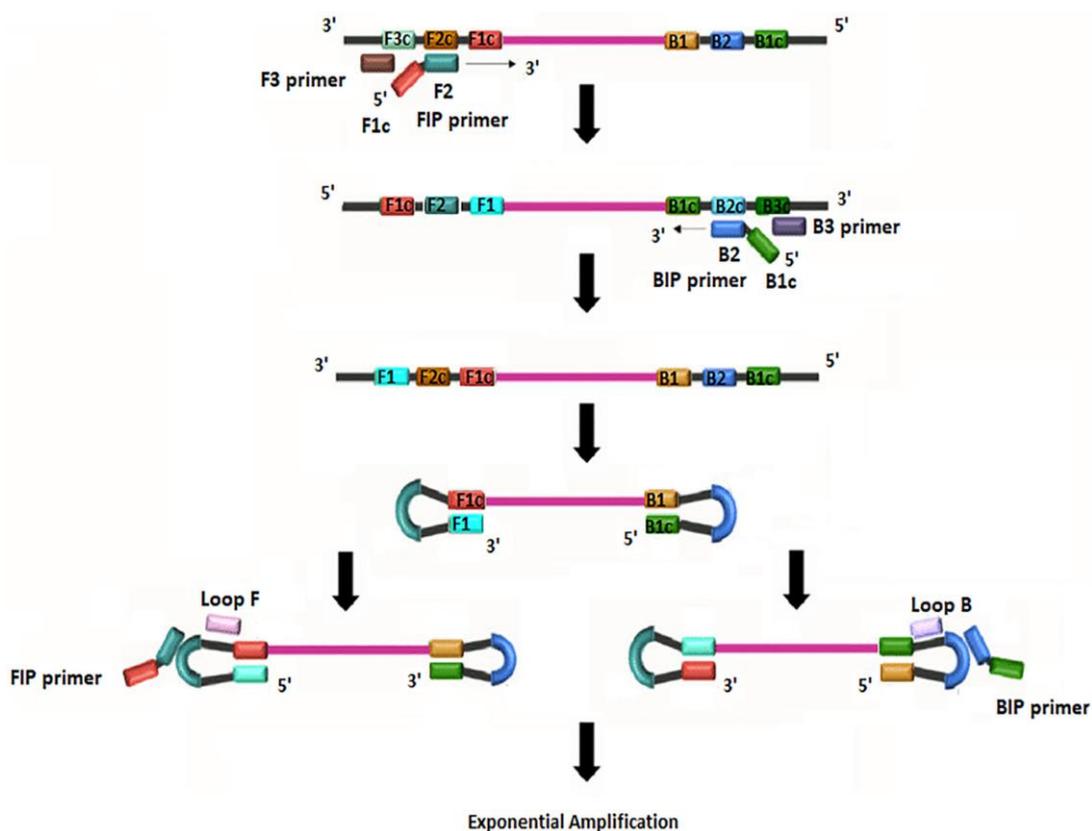
Na LAMP, a amplificação dos genes ocorre pela repetição de dois tipos de reações de alongamento, nas regiões do *loop*, dessa forma, ocorre um autoalongamento da fita molde a partir do *loop* que foi formado, seguida da ligação e alongamento a partir de novos *primers* para a região do *loop* (NOTOMI, 2015). As reações de alongamento são repetidas sequencialmente pela síntese de deslocamento de fita mediada por DNA polimerase usando

as regiões de alça mencionadas acima como um estágio (NAGAMINE et al., 2002; NOTOMI, 2015).

De forma complementar, Nagamine et al., (2002) desenvolveram um método que acelera a reação de LAMP através da adição de dois conjuntos de *primers* denominados “*primers loop*”. Esses *primers* se misturam à porção que forma os *loops*, diminuindo o tempo necessário para realizar a reação em menos da metade do tempo inicialmente proposto para a técnica, ou seja, menos de uma hora, facilitando ainda mais as análises genéticas (NAGAMINE et al., 2002).

A LAMP se diferencia em diversos aspectos em relação a outros métodos de amplificação (como a PCR), por exemplo, apenas um tipo de enzima é necessário e a reação pode ser realizada em temperatura constante em menos de uma hora.

Figura 6: Reação de LAMP otimizada com a adição de dois *primers loop*, também chamados



de LF e LB. Fonte: Chaouch, M. (2021).

Uma das principais vantagens da LAMP é a capacidade de amplificar diretamente as sequências de DNA em condições isotérmicas, sem necessitar de um molde para a desnaturação do DNA, sendo também possível amplificar RNA com eficiência utilizando em conjunto a transcrição reversa (NOTOMI, 2015).

Devido às suas vantagens, a LAMP vem ganhando grande destaque em áreas como testes virais rápidos para COVID-19 (KASHIR, YAQINUDDIN, 2020; CHAOUCH, 2021), na detecção de patógenos como *Escherichia coli*, Influenza A, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus* (MORI et al, 2013; LI et al, 2017) e na detecção da autenticidade de alimentos processados de salmão e truta (XIONG et al, 2020; XIONG et al, 2021, 2021) assim como em nadadeiras de tubarões (BUT et al., 2020).

No presente estudo serão analisados os peixes da família Serrasalminidae: *Piaractus mesopotamicus* (pacu), *Colossoma macropomum* (tambaqui) e seus híbridos interespecíficos devido ao seu grande interesse comercial e econômico e que podem causar danos ambientais pelo manejo incorreto. (HASHIMOTO et al, 2012; MARTINS, 2017).

Ainda não existem trabalhos que utilizam a LAMP com esse objetivo e, dessa forma, este trabalho visa estabelecer um protocolo e propor o uso da LAMP como método mais rápido, eficaz e de baixo custo para a identificação de espécies em trabalhos de campo e por produtores em pisciculturas.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo, aplicar e padronizar a técnica LAMP para identificar as espécies *Colossoma macropomum* e *Piaractus mesopotamicus* e seu híbrido (“tambacu”), utilizados na piscicultura brasileira.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de peixes redondos puros de *Piaractus mesopotamicus* (pacu), *Colossoma macropomum* (tambaqui) e seu híbrido interespecífico (tambacu) foram obtidas do banco de tecidos do Laboratório de Genética de Peixes, LAGENPE, para avaliar a especificidade do ensaio de LAMP no diagnóstico de identificação de espécies. A identidade de cada indivíduo puro e híbrido foi verificada através da técnica de PCR multiplex desenvolvida para identificação dessas espécies e seus respectivos híbridos. No total, foram utilizadas 42 amostras para extração, sendo 18 de exemplares da espécie *Piaractus mesopotamicus* (pacu), 16 de exemplares da espécie *Colossoma macropomum* (tambaqui) e 8 de exemplares do híbrido (tambacu) envolvendo essas duas espécies. Para o ensaio de LAMP, foram utilizadas apenas amostras com boa qualidade da extração do DNA, sendo 20 amostras no total, onde 13 amostras eram de exemplares de pacu, 5 de exemplares de tambaqui e 2 de exemplares do híbrido.

Inicialmente, foram realizadas extração e purificação do DNA genômico total de cada amostra de tecido da nadadeira caudal coletadas dos exemplares amostrados utilizando o kit comercial “*Wizard Genomic DNA Purification kit* - Promega (Prodimol Biotecnologia, Belo Horizonte, Minas Gerais Brazil), de acordo com o protocolo padrão do laboratório. Após a retirada de uma pequena amostra de tecido, cada amostra de tecido foi adicionada a 300 µl

de *Nuclei Lysis Solution* e 4 µl de Proteinase K e incubadas posteriormente por 2 horas em banho-maria a 60°C. Em seguida, foi adicionado 3,0 µl de RNase incubados por 30 minutos em banho-maria a 37°C. Foram adicionados 200 µl de *Protein Precipitation Solution* e levados a temperatura de -80°C por 5 minutos, seguido de uma etapa de centrifugação a 13.000 rpm por 4 minutos, retirando-se o sobrenadante e transferindo para outro tubo contendo 600 µl de isopropanol. Novamente foi centrifugado por 4 minutos a 13.000 rpm, descartando o sobrenadante e adicionando 600 µl de etanol 70%. Novamente os tubos foram centrifugados por 4 minutos a 13.000 rpm, seguido do descarte do sobrenadante. O material foi seco em estufa a 37°C por 1 hora e posteriormente foram adicionados 35 µl da solução de DNA *Rehydration Solution*. A integridade e quantidade das amostras de DNA foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com corante fluorescente GelRed TM 1X (Uniscience) e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (Loccus Biotecnologia).

Após a extração de DNA foram aplicados marcadores nucleares previamente desenvolvidos e caracterizados por Prado et al. (2011), Hashimoto et. (2013) e Palumbi (1996) na reação de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) multiplex para confirmar a identidade de cada amostra. Para a amplificação dos genes, foi empregada a PCR multiplex, através do uso de pares de *primers forward* (F) e *reverse* (R) e os *primers* espécie-específicos previamente desenhados, de acordo com o gene a ser analisado. O volume total foi de 25 µl por amostra, contendo: 150 µl de cada dNTP; 1,5 mM MgCl₂; 1X de Buffer; 2 mM de cada *primer*; 0,2 U de *Taq* e 10-30 ng de DNA. O tamanho dos produtos da PCR foi quantificado em gel de agarose 2,5% através da comparação com o padrão do marcador ladder Low DNA Mass Ladder (Invitrogen), que possui peso molecular e concentração conhecidos.

Todos os *loci* foram amplificados no termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), seguindo as condições de desnaturação inicial a 95° C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos, com desnaturação a 95°C por 40 segundos, temperatura de anelamento variando de 50 a 58° C por 40 segundos e extensão a 72°C por 10 a 20 segundos.

Para identificar qual método seria mais vantajoso e mais rápido, também foram utilizadas amostras de nadadeiras frescas na reação de LAMP, para verificar se a reação pode acontecer sem a necessidade de extração de DNA, tornando o método ainda mais rápido. Neste caso, para cada amostra foi aplicado o kit da LAMP, assim como os *primers* já desenhados e colocou-se cada amostra com tempos diferentes entre si em temperatura constante a 65° C em banho-maria para verificar quanto tempo seria necessário para tal reação ocorrer. As amostras foram então divididas em dois grupos: apenas com tecido (sem nenhum tipo de tratamento), onde aplicou-se a LAMP e os *primers* diretamente no tecido, mantendo a reação à temperatura constante a 65 °C por duas horas; e utilizando cell lysis, junto com a LAMP e os *primers*, onde quatro amostras de um mesmo indivíduo foram mantidas em banho-maria à 65°C por 20 horas, 3 horas, 1 hora e por fim, por 30 minutos cada uma delas respectivamente.

Além disso, foi verificada a quantidade de DNA em nanogramas/microlitros em cada amostra utilizando-se o Kit Qubit por foto fluorescência, a fim de padronizar as amostras que seriam mais adequadas para a utilização da técnica de LAMP posteriormente, dando preferência para aquelas que mais se aproximavam de 50ng/μl, de acordo com a literatura utilizada. Para isso, foram utilizados 199μl de tampão Qubit BR, 1μl de fluorescência para formar o mix inicial calculado pelo número de amostras + 2 (para o *standard*). A partir disso, com os 200μl obtidos para cada amostra, são adicionados em eppendorfs de 0,5ml próprios

do kit junto com 2µl de DNA. Feito isso, os eppendorfs são passados no vórtex e então, limpos e colocados no leitor fluorimétrico para a leitura da quantificação de DNA.

O conjunto de *primers* LAMP diagnósticos foi desenhado utilizando o software NEB LAMP *Primer Design Tool*, versão 1.0.1 ([www.https://lamp.neb.com/#/](https://lamp.neb.com/#/)), baseado nas regiões de anelamento de *primers* de cada gene que apresentarem maiores diferenças entre as espécies. Foram testados os *primers* previstos na literatura para essas espécies, dando preferência para o que apresentou melhor anelamento dos primers com as regiões de polimorfismos, sendo assim, foi escolhido o gene RAG2 (Gene Ativador da Recombinação 2 (Recombination Activating Gene 2)). Seis sequências disponíveis do gene nuclear RAG2 de cada uma das espécies foram obtidas do GenBank e alinhadas utilizando o Geneious (versão 7.1.3) (*Bioinformatics Software for Sequence Data Analysis*) para selecionar as regiões conservadas, obtendo regiões de ligação dos *primers* que abrangem essas regiões. Além disso, foi feito o alinhamento entre as sequências do gene RAG2 das espécies *P. mesopotamicus* e *C. macropomum* para que fossem selecionadas as regiões diagnósticas, com maior quantidade de polimorfismos e disparidades entre as espécies. Todos os seis pares de *primers* de cada espécie foram desenhados utilizando NEB LAMP Primer Design Tool (versão 1.0.1). Além disso, os genes das duas espécies (*P. mesopotamicus* e *C. macropomum*) foram alinhados junto com os *primers* obtidos pelo software NEB LAMP para a verificação da especificidade dos *primers*.

Então, foi realizada a otimização do ensaio LAMP para testar e identificar qual tamanho do fragmento de DNA alvo é mais eficiente para a amplificação e diagnóstico. O volume total foi de 25 µl por amostra, contendo: 12,5 µl de WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix (New England BioLabs® inc.); 2,5 µl do *primer* mix (10X) contendo alíquotas dos 3 pares de *primers*; 9 µl de dH₂O e 50 ng (1µl) de DNA alvo. A reação foi incubada a 65°C

por 60 minutos e a verificação do produto foi feita a olho nu, por observação da mudança de cor dos tubos: para cor amarela, significa que ocorreu a amplificação total dos *primers*, para a cor-de-rosa, indica que não houve nenhuma amplificação, enquanto que para a cor alaranjada, indica que a reação não ocorreu completamente (que pode ser atribuído ao anelamento incompleto ou parcial dos *primers* ou pouco período de incubação).

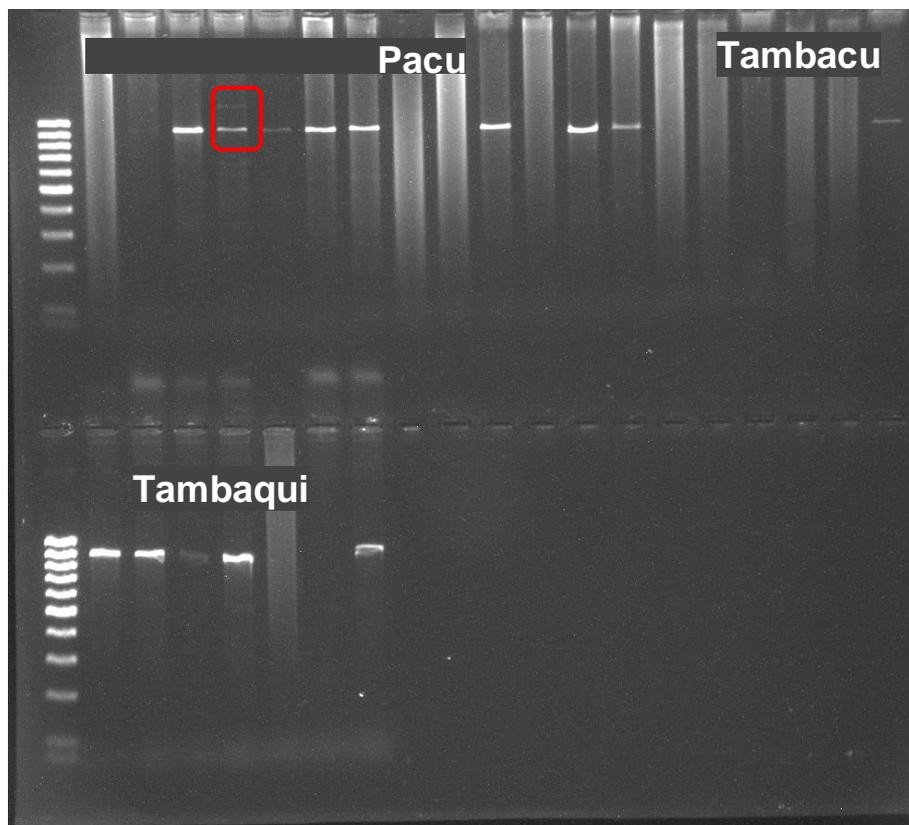
Figura 7: Tabela com *primers* desenhados para *P. mesopotamicus* e *C. macropomum* a partir do gene RAG2 através do software *NEB LAMP Primer Design Tool*, versão 1.0.1.

Espécies	<i>Primers LAMP</i>	Tamanho (pb)	Sequências
<i>P. mesopotamicus</i>	F3	20	ACCAGTCAGACTCCCAGAAG
	B3	18	GCAGGATTTCCCTCCGAC
	FIP	41	ACTGTGGTGGCTCTCGAGGTTCCGAATGCAGTGCACCTACG
	BIP	40	CAGTGAGATCAGCCAGAGCCGCAATCAATGCGCTCCCCTT
	LF	21	ACGTATGCCTACATCATCCAG
<i>C. macropomum</i>	F3	20	TGGCTCGAGAGGATTGTGTT
	B3	19	TGGTAGCCACCAAGGATGA
	FIP	38	GAGAAGCTCCACACGCAGCCGCCACATTCTCTCCACCG
	BIP	41	AGGCAGCCCAGTTCTCTCTTGTCCCACAGGAGTTGCAATGG
	LB	25	AATGATGGTCTGTCTATTACAAGCG

4. RESULTADOS

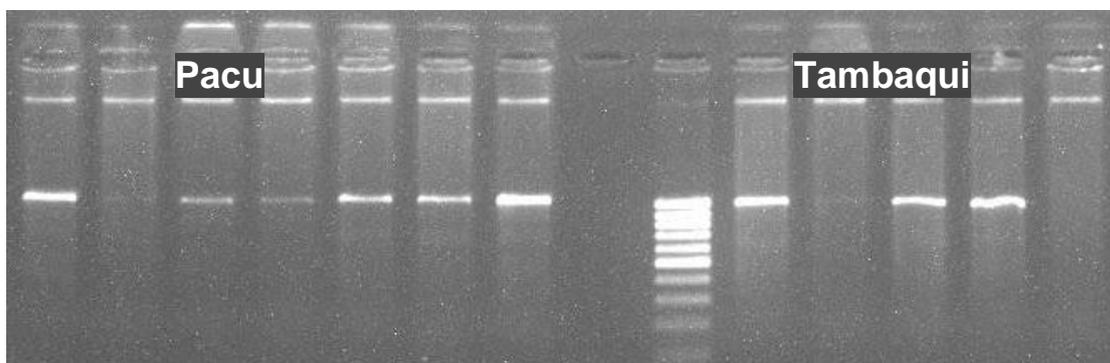
Inicialmente, foi realizada a PCR das amostras para confirmar indivíduos puros ou híbridos, verificando que as espécies escolhidas estavam corretamente identificadas. Foi então realizada a LAMP e confirmou-se que o método foi capaz de detectar os indivíduos corretamente, obtendo o mesmo resultado da PCR.

Figura 8: PCR das amostras de pacu, tambacu e tambaqui, respectivamente. Circulado em vermelho, a amostra de pacu que apresentou outra banda durante a análise da PCR.



Algumas amostras não apresentaram bandas na PCR e, portanto, não foram utilizadas nos ensaios de LAMP. Aqueles que apresentaram bandas fortes foram escolhidos para os testes, enquanto para aqueles com poucas ou nenhuma marcação satisfatória, foram trocadas por amostras por de outros indivíduos de espécies correspondentes.

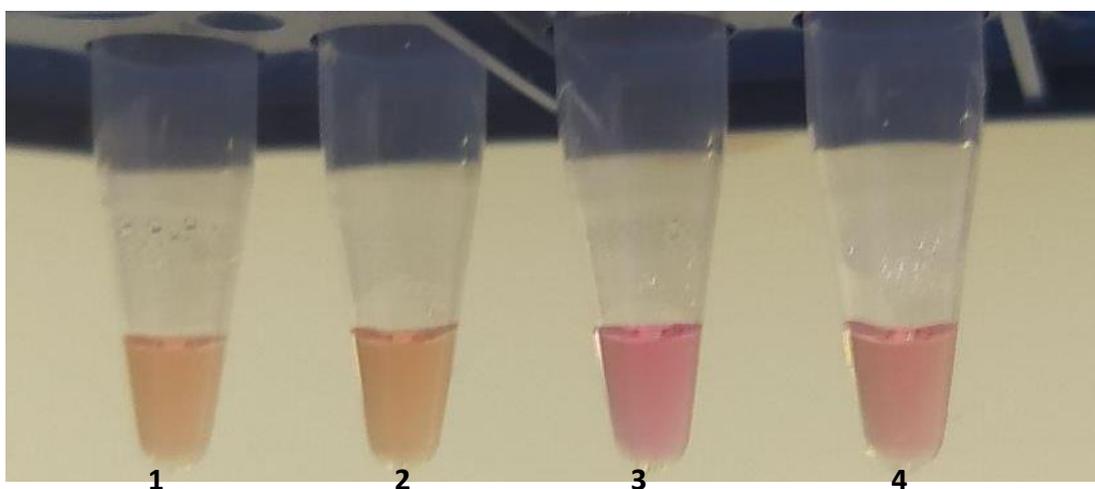
Figura 9: PCR de amostras de pacu e tambaqui.



Os *primers* obtidos *core* e *loop*, diagnósticos para *P. mesopotamicus* e *C. macropomum*, foram utilizados para aplicação da técnica de LAMP. Após a aplicação da LAMP em amostras de DNA de pacus, tambaquis e tambacus, observou-se a mudança de coloração nos tubos (Figura 8), indicando que a técnica detectou corretamente as espécies de acordo com os *primers* utilizados.

No primeiro teste com a LAMP (Figura 8), notou-se que a mudança de coloração ocorreu como esperada para a maioria das amostras, embora tenha sido necessário deixar a reação ocorrer por cerca de 2 horas à temperatura constante de 65 °C no termociclador, que foi utilizado para garantir que a temperatura se mantivesse estável durante todo o processo. Além disso, uma das amostras não corou de acordo com o esperado, porém, analisando-se novamente a imagem do gel da PCR desses indivíduos, notou-se marcação muito fraca de uma segunda banda, indicando que a espécie não era pura e que a LAMP de fato funcionou corretamente.

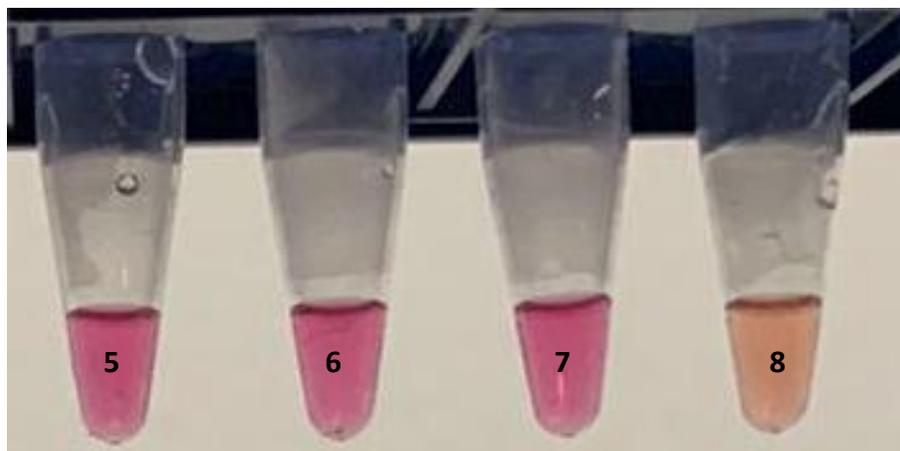
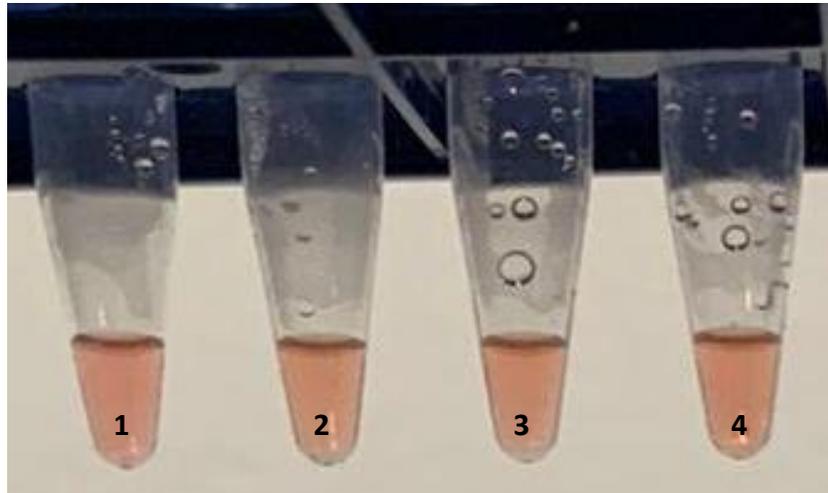
Figura 10: Primeira reação de LAMP. Da esquerda para a direita: (1) Amostra de pacu com *primer* diagnóstico de pacu, (2) amostra de pacu com *primer* de tambaqui, (3) amostra de tambaqui com *primer* de pacu e (4) amostra de tambaqui com *primer* de tambaqui.



No segundo teste (Figura 11), foram utilizados indivíduos puros de pacu (**11a**) e tambaqui (**11b**), assim como um híbrido encontrado através da PCR.

A mudança na coloração significa que houve amplificação das amostras. No caso dos pacus, a amplificação ocorreu corretamente, assim como para o indivíduo híbrido. Já no caso dos tambaquís, a amplificação não ocorreu, já que o tubo permaneceu na cor rosa.

Figura 11: Reação de LAMP, em **a)** tubos contendo amostras de indivíduos diferentes de pacu com *primer* específico de pacu (1-3) e um híbrido com *primer* de pacu (4) e em **b)** Tubos contendo amostras de indivíduos de tambaqui com *primer* de tambaqui (5-7) e um híbrido com *primer* de tambaqui (8).



Já no terceiro teste (Figura 12), após a confirmação de que a técnica funcionou corretamente, utilizou-se tecidos da nadadeira dos peixes para testar se a reação ocorreria normalmente sem precisar da extração de DNA, tornando o método ainda mais rápido. Para isso, foram utilizadas as mesmas amostras dos peixes usadas anteriormente nas primeiras aplicações da LAMP, porém divididas em: apenas com tecido (Figura 12 e 15), com extração (Figura 13) e utilizando *cell lysis* (Figura 15), como descrito na seção 3 (materiais e métodos). Todas as amostras apresentaram uma pequena variação de cor após a saída da incubação

(Figura 14a), porém apenas se tornaram completamente amarelas algumas semanas após a aplicação da técnica (Figura 14c).

Figura 12: Reação de LAMP em tecidos frescos de nadadeira de pacus com *primers* de pacu. A amostra número 5 é o controle negativo para comparação de cor entre os tubos.

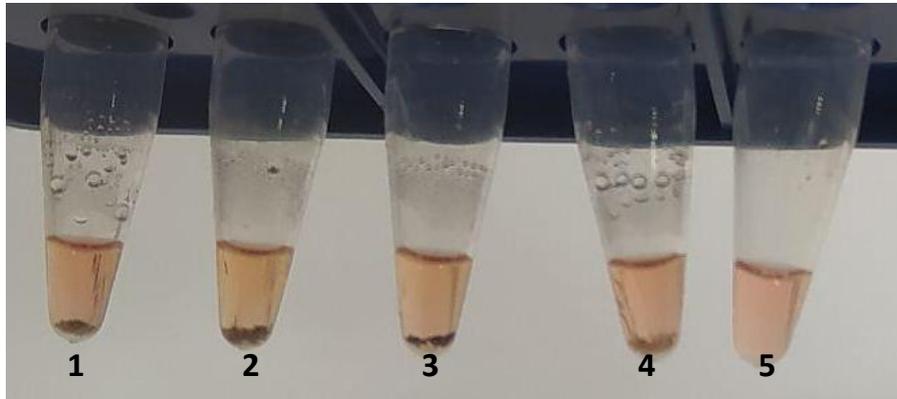


Figura 13: Amostras de pacus com extração de DNA dos mesmos indivíduos utilizados na LAMP com tecido fresco (Figura 12) para comparação de cor dos tubos, utilizando o *primer* de pacu. Neste, a maioria dos tubos ficaram levemente alaranjado claro, enquanto no de tecido, os tubos apresentaram coloração mais rosada. A última amostra (número 5) é o controle negativo para checar a diferença de cor.

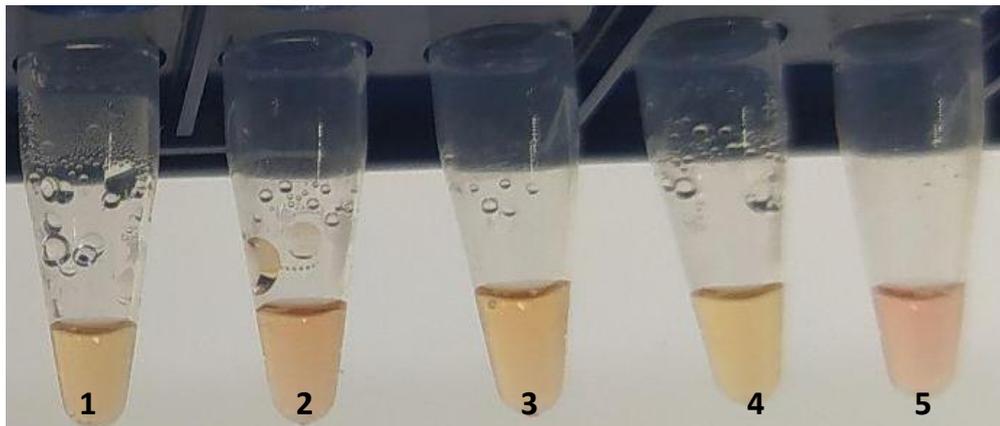
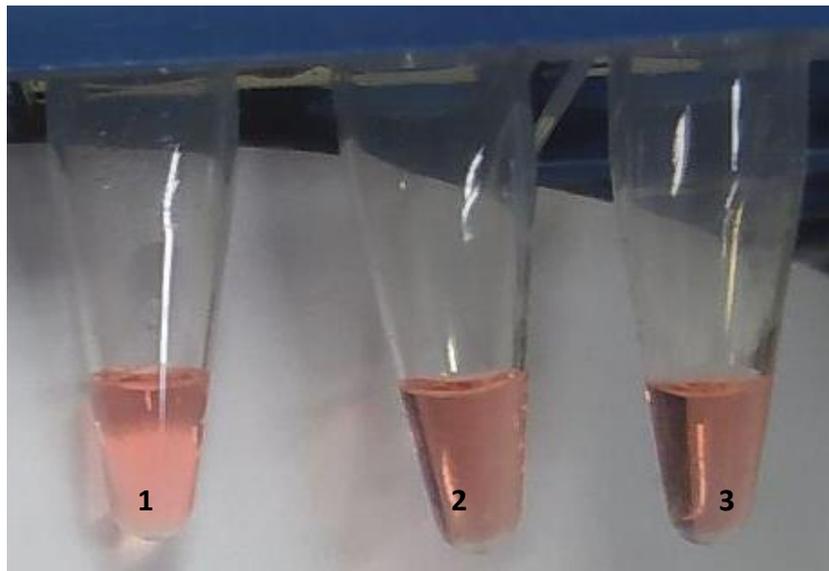
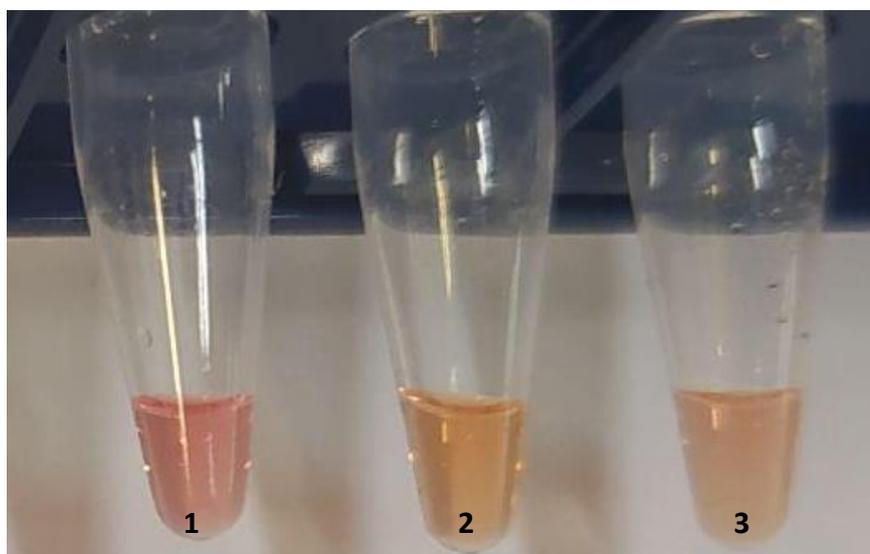


Figura 14: Coloração das amostras de tecido de um mesmo indivíduo utilizando cell lysis e após isso, aplicação da reação de LAMP. **a)** Da esquerda para a direita: amostra de extração (número 1) e amostras de nadadeira com cell lysis deixadas em banho-maria por 20 horas (número 2) e 3 horas (número 3), respectivamente. **b)** Coloração das mesmas amostras após uma semana. **c)** Coloração das mesmas amostras após 4 semanas, com adição de novas amostras tratadas com *cell lysis* e mantidas por 1 hora (número 4) e 30 minutos (número 5), respectivamente, após 4 semanas de saída do banho-maria.

a)



b)



c)

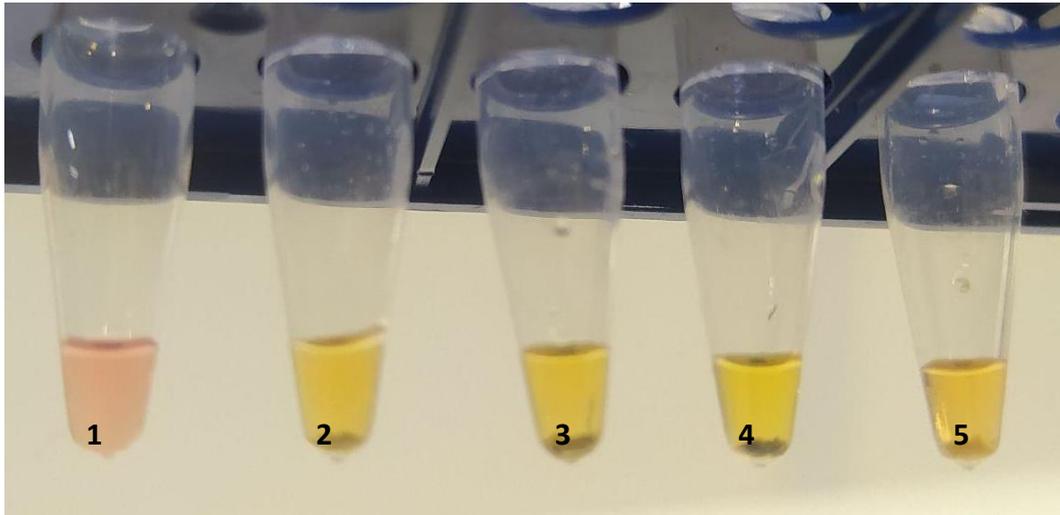
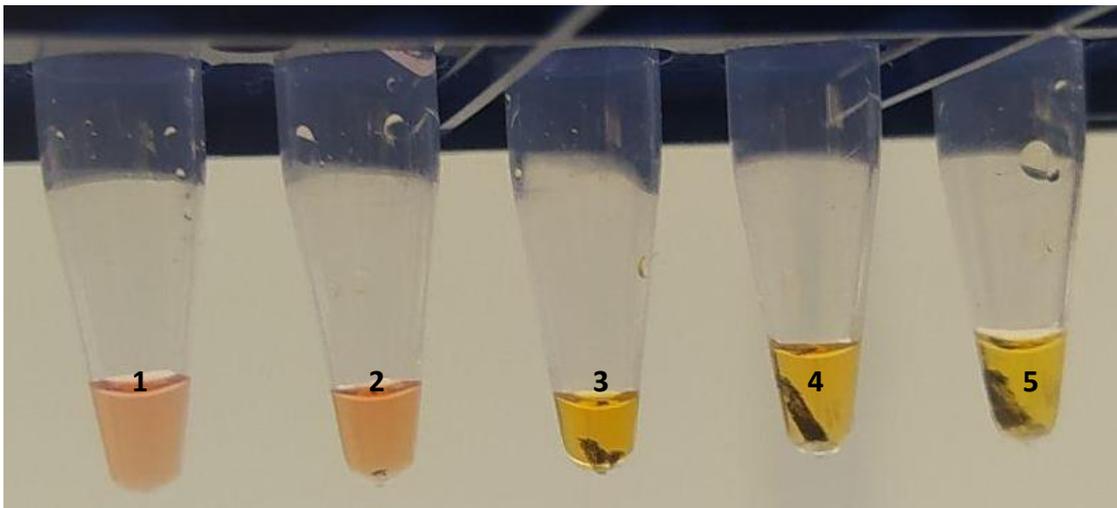
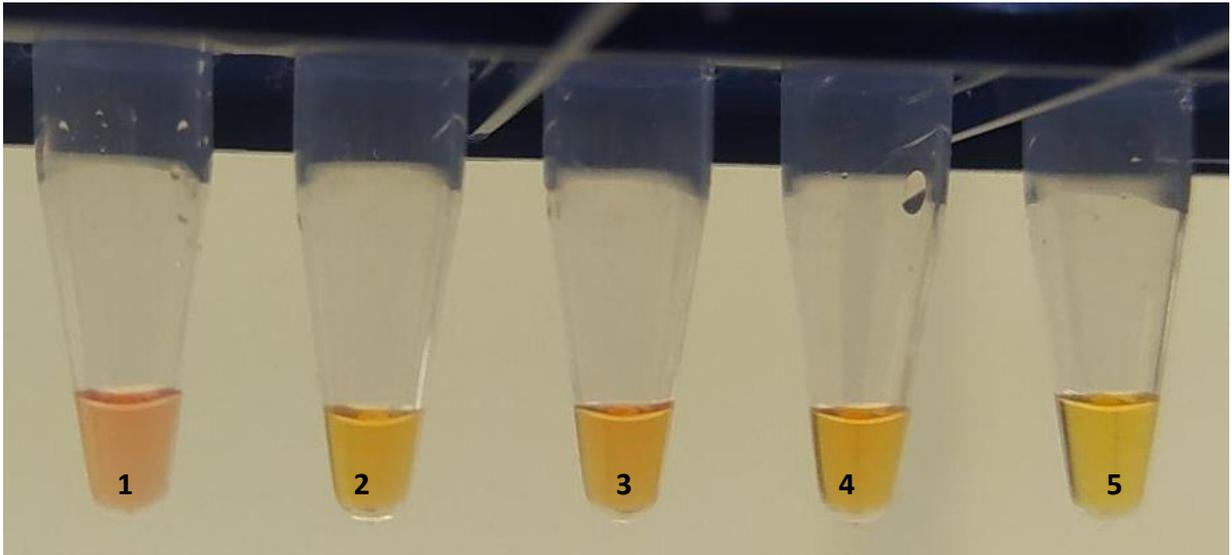


Figura 15: Coloração das amostras de tecido de pacu com *primers* de pacu **(a)** da terceira aplicação de LAMP e de extração **(b)** com os mesmo *primers* após 3 semanas. Em **a)** Mudança de cor observada após três semanas em amostras de tecidos a partir da reação de LAMP. O primeiro tubo à esquerda (1) corresponde ao controle negativo e em **b)** Mudança de cor observada após três semanas em amostras de extração de pacu a partir da reação de LAMP. O primeiro tubo à esquerda (1) corresponde ao controle negativo.

a)



b)



Para confirmar que a quantidade de DNA estava sendo um fator que influenciava nos resultados, foi feita uma quantificação de DNA nas amostras utilizadas, onde, felizmente, as amostras escolhidas estavam apresentando entre 40 e 88 microlitros de DNA, correspondendo próximo ao esperado, que era de no mínimo 50 μ l de acordo com a literatura utilizada.

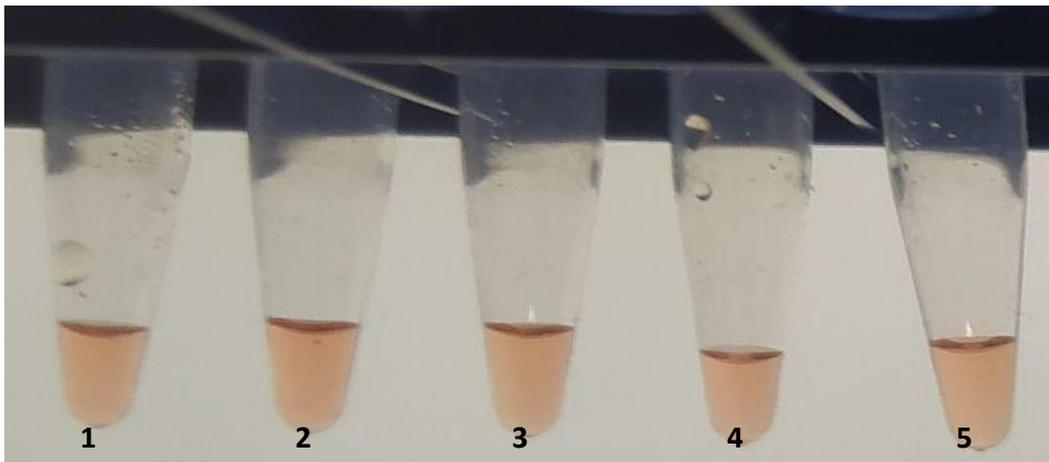
Ainda, para confirmar se os resultados estavam corretos, foi realizada a PCR das amostras utilizadas, seguindo o protocolo descrito na seção 3 (materiais e métodos) para o gene RAG2. Após isso, foi realizado uma nova aplicação da LAMP, desta vez, apenas com amostras contendo mais de 50 μ l de DNA, que apresentaram bandas satisfatórias na PCR e que já haviam apresentado mudança de cor nos testes anteriores, sendo portanto, utilizadas 5 amostras no total. Feito isso, a LAMP foi aplicada novamente para espécies de pacus e tambaquis, porém desta vez, adicionou-se uma nova amostra de híbrido.

Assim, na quarta vez em que se aplicou a LAMP, a mudança de cor inicial não foi tão aparente quanto nas outras aplicações (Figura 16), porém, do mesmo modo que

anteriormente, a mudança de cor foi gradualmente mudando conforme o tempo, ficando completamente amarela em indivíduos puros e laranja no híbrido (Figura 17 e 18).

Figura 16: Aplicação da LAMP em amostras de extração de indivíduos de pacu, tambaqui e tambacu. **a)** Aplicação de *primers* de tambaqui em amostras de extração de indivíduos de pacu (1 e 2), tambaqui (3 e 4) e tambacu (5), respectivamente. **b)** Aplicação de *primers* de pacu em indivíduos de pacu (1 e 2), tambaqui (3 e 4) e tambacu (5), respectivamente.

a)



b)

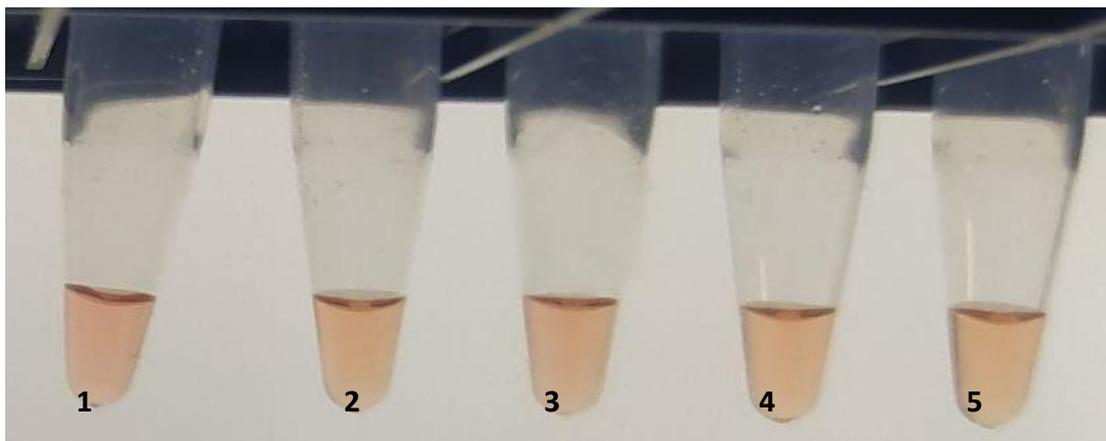


Figura 17: Da esquerda para a direita: Amostra de pacu com *primer* diagnóstico de pacu (1) (coloração amarela), amostra de tambaqui com *primer* diagnóstico de tambaqui (2) (coloração amarela), tambacu (3) (híbrido corado em laranja) com *primer* diagnóstico de tambaqui e, tambacu com *primer* diagnóstico de pacu (4).

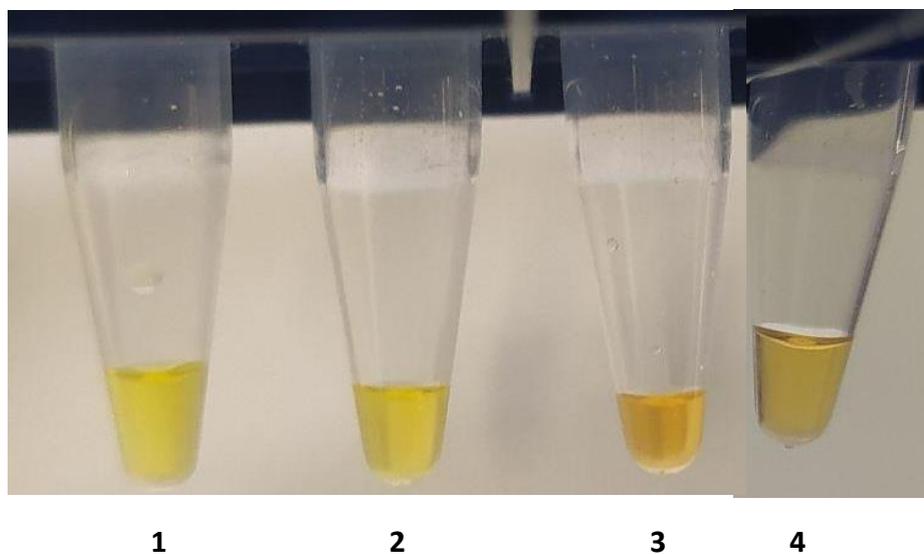
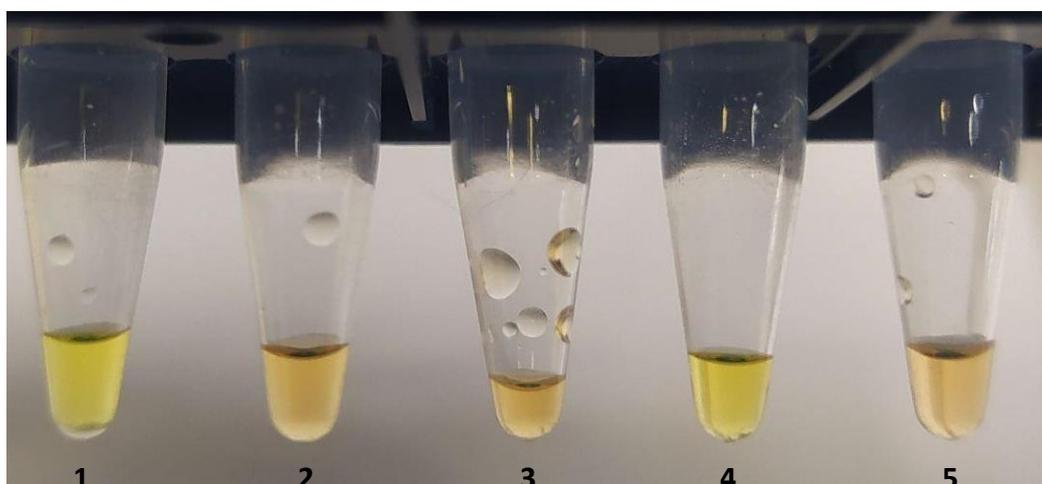


Figura 18: Da esquerda para a direita: Amostra de pacu com *primer* diagnóstico de pacu (1) (coloração amarela), amostra de pacu com *primer* diagnóstico de tambaqui (2), amostra de tambaqui com *primer* diagnóstico de pacu (3), amostra de tambaqui com *primer* diagnóstico de tambaqui (4) (coloração amarela) e, por último (5), o controle.

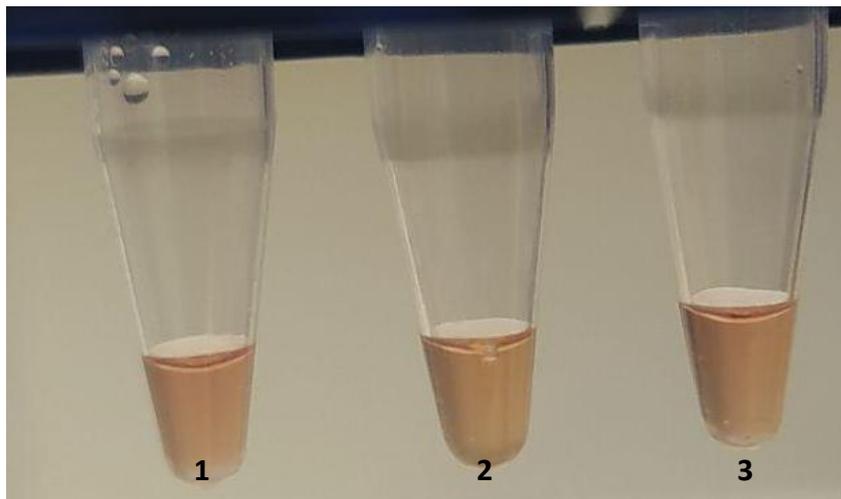


A coloração amarela indica que a reação foi completa, assim, os *primers* foram amplificados totalmente e portanto, são espécies puras, enquanto os indivíduos híbridos apresentaram coloração igual ao controle e, portanto, indica que a reação não ocorreu.

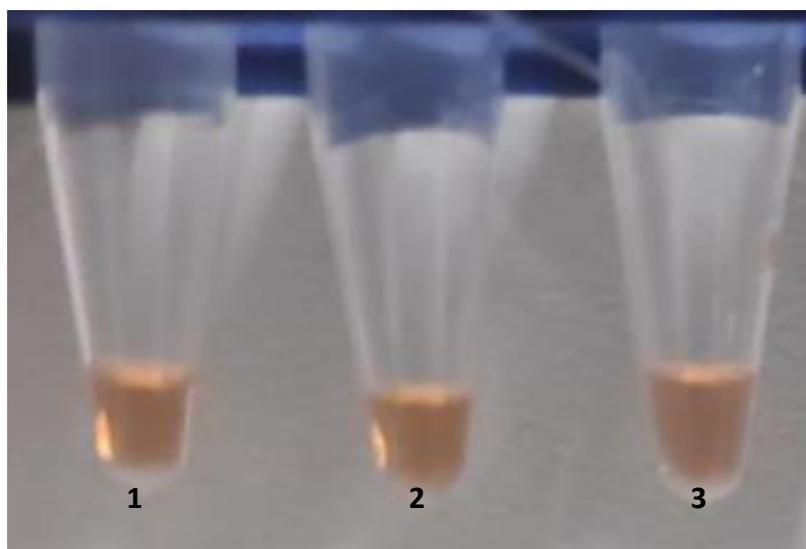
Para ter certeza de que o teste estava correto, aplicou-se novamente a LAMP com os mesmos indivíduos.

Figura 19: Aplicação da LAMP em amostras de extração de pacu (1), tambaqui (2) e tambacu (3), todos com *primers* de pacu. **a)** Após saída da incubação. **b)** Após duas semanas.

a)



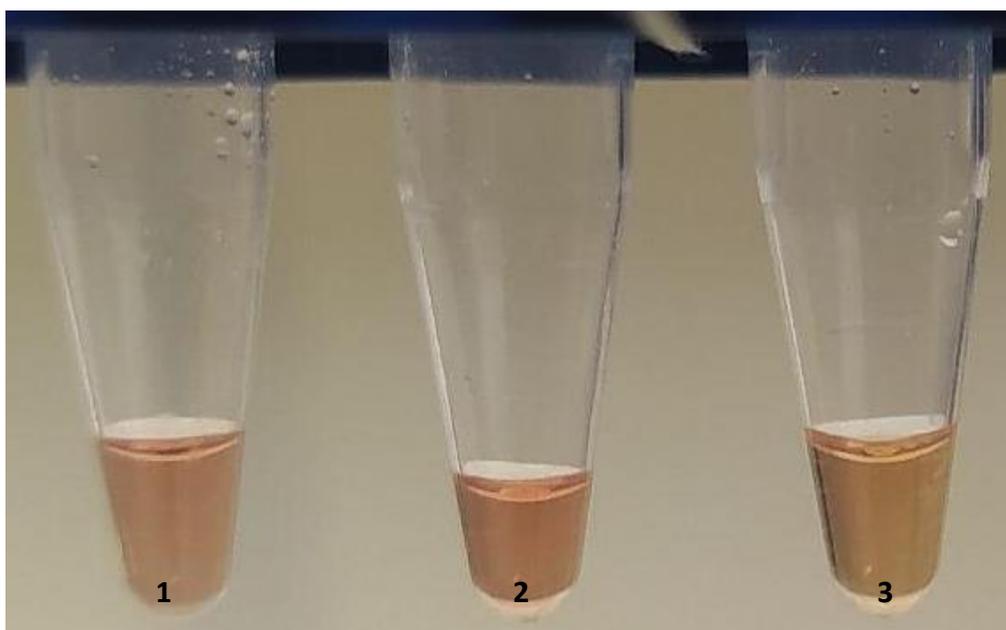
b)



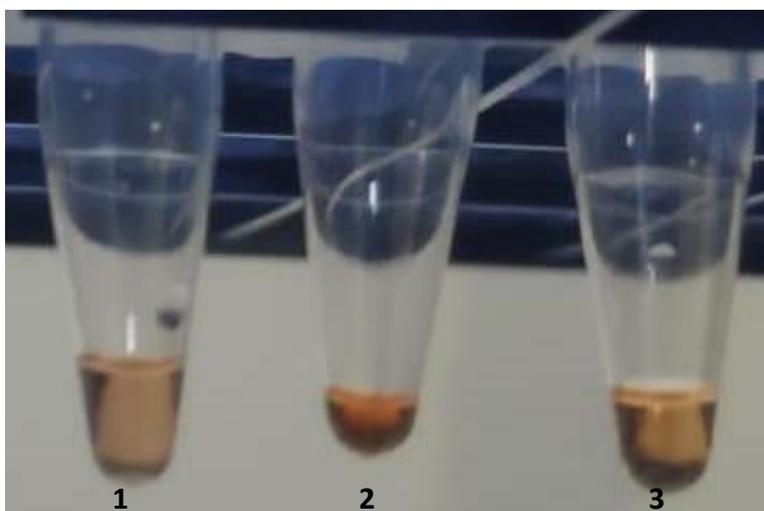
Aparentemente a mudança de coloração levou mais tempo nas últimas amostras, porém nota-se que os tubos estavam com a cor mais clara do que no início.

Figura 20: Aplicação da LAMP em amostras de extração de pacu (1), tambaqui (2) e tambacu (3), todos com *primers* de tambaqui. **a)** Após saída da incubação. **b)** Após três semanas.

a)



b)



A coloração dos tubos também permaneceu sem grandes mudanças na cor, onde apenas a amostra de tabaqui (2) apresentou coloração mais intensa em relação ao começo e redução da quantidade de líquido presente no tubo, o que pode ter contribuído para a variação de cor.

As espécies puras e híbridas corresponderam aos resultados encontrados na PCR (Figura 8 e 9), onde notou-se que os indivíduos escolhidos para a LAMP eram de fato espécies puras, além do híbrido.

5 DISCUSSÃO

Para a obtenção dos *primers*, foram verificados os genes: TROP, EF 1 N, 16S, globina e CitB (Citocromo B), escolhendo-se o gene RAG2 para este trabalho. Porém, a utilização de outros genes se tornou inviável devido a impossibilidade de obtenção de *primers* LAMP através do software que foi utilizado. Além disso, o CitB não foi utilizado devido à herança materna do gene mitocondrial. O RAG2 foi o gene que mais se aproximou do esperado, ligando-se nas regiões diagnósticas de cada espécie, o que tornou sua utilização viável. Porém, devido a “gaps” encontrados no alinhamento, a obtenção de um *primer loop* de cada espécie, responsável por acelerar a reação não foi obtido através do software utilizado e, dessa forma, a reação da LAMP foi realizada em mais tempo do que o encontrado na literatura, utilizando cerca de uma hora e trinta minutos no mínimo e máximo de duas horas para certificar que o resultado fosse condizente com o esperado.

No início, quando a técnica surgiu, Notomi et al., 2000, eram utilizados apenas 4 pares de *primers* (*core*), sem a utilização dos outros dois pares (*loop*) que aceleram a reação

e que foram introduzidos posteriormente por Nagamine et al., 2002. Assim concluiu-se que a técnica funcionaria de maneira similar a descrita originalmente, apenas sendo necessário aumentar o tempo de incubação. Como os testes iniciais ocorreram dentro do esperado, apresentando mudanças de cor nos tubos, concluiu-se que a técnica funcionou e então, prosseguiu-se com o protocolo e os *primers*.

Após a aplicação da técnica esperávamos que as amostras de pacu ficassem da cor amarela, porém essa mudança só ocorreu após 3 semanas de espera. Possivelmente, pode-se atribuir esse resultado a falta de um *primer loop* de cada espécie, ou no caso dos tambaquis, a quantidade de DNA que não foi suficiente para ocorrer a ligação dos *primer* atrasando o tempo de reação. Posteriormente, foram trocadas as amostras de tambaqui por outras mais frescas e o resultado foi diferente deste, assim, pode-se concluir que essas amostras de tambaqui não deram certo pela qualidade ou até mesmo quantidade do DNA presente que foi insuficiente na reação.

Em uma outra aplicação da técnica, os resultados deste teste não corresponderam completamente com as expectativas, porém isso pode ser atribuído ao tipo de tecido utilizado, uma vez que em um trabalho paralelo desenvolvido por Lein, 2022 (em fase de elaboração), notou-se que em tecido muscular houve resposta imediata da técnica, com mudança total de coloração sem necessidade da incubação, demonstrando que a quantidade de DNA presente nos diferentes tecidos podem influenciar os resultados obtidos. Entretanto, vale ressaltar que neste trabalho citado havia a presença de todos os *primers* necessários e que o trabalho foi desenvolvido com o gene Citocromo B, diferentemente do utilizado para os serraselmídeos. Além disso, os resultados com os serraselmídeos podem ter apresentado demora na mudança de cor em decorrência da falta

de dois *primers* que aceleram a reação, sendo possível atribuir isso à necessidade de mais tempo na incubação e na espera de resultados.

Após esses resultados, fizemos uma nova etapa de testes e a diferença de cor entre este e o primeiro evidencia que a mudança no tempo de observação influenciou na coloração do controle e das amostras, uma vez que as primeiras amostras testadas estavam ou laranja (para resultado positivo) ou rosa (para resultado negativo), enquanto neste teste encontrou-se a coloração amarela e alaranjada para as mesmas situações. Além disso, a quantidade de DNA observada nessas amostras eram maiores do que as primeiras, o que pode também ter influenciado no resultado final. O único teste na amostra de híbrido que foi viável, ficou de cor alaranjada como o esperado, comprovando que a técnica funcionou para o proposto, porém com tempo prolongado em temperatura ambiente após a reação para que a coloração do tubo se modificasse totalmente.

Verificou-se que algumas extrações de amostras de pacu utilizadas não apresentaram quantidade de DNA dentro do ideal de acordo com a literatura, que pode ser atribuído às condições de armazenamento, data de coleta e até mesmo do número de células presentes na amostra. Assim, foram utilizadas as amostras com valores mais próximos de 50 µl. Para aplicação deste trabalho em pisciculturas e em campo, a otimização do ensaio de LAMP será necessária para o gene RAG2, possivelmente através da identificação dos *primers loop* para aceleração dos resultados, ou verificação da mudança de tonalidade. Porém ainda vale ressaltar que a técnica apresentou grande eficácia e serviu ao que foi proposto, sendo assim, ainda sem otimizar, seria uma técnica alternativa mais barata e viável do que a PCR para locais sem a devida infraestrutura. Além disso, mais estudos são necessários para identificar quais genes são mais adequados para obtenção dos *primers* completos (incluindo os *primers*

loop) a aplicação da técnica garantindo a detecção e diferenciação de espécies puras e híbridas.

6 CONCLUSÃO

No presente trabalho foi possível pela primeira vez realizar o diagnóstico das espécies *P. mesopotamicus* e *C. macropomum*, assim como seu híbrido interespecífico (tambacu) através da técnica de LAMP, sendo desenvolvido um protocolo utilizando o gene RAG2. A aplicação da técnica se mostrou eficiente, notando-se mudanças na coloração dos tubos imediatamente após a aplicação da técnica, porém apenas ficando completamente distintos após período prolongado.

Os resultados observados foram validados pela comparação feita com a PCR multiplex, que tiveram os mesmo resultados para as espécies estudadas. Embora a coloração tenha mudado totalmente apenas após algumas semanas, a LAMP funcionou corretamente na identificação de espécies puras e seu híbrido, apresentando coloração diferente para cada uma delas. Os resultados foram visíveis no momento em que foi retirado da incubação, porém foi necessário aguardar algum tempo até que mudasse totalmente de cor, não reduzindo sua qualidade e eficácia na detecção das espécies. Foi verificado também que utilizando o tecido do músculo, os resultados são mais rápidos e evidentes do que em amostras da nadadeira, portanto sugere-se utilizar este tecido ao reproduzir a técnica.

Dessa forma, foi possível a validação da técnica LAMP para a identificação das espécies dos peixes em questão, diagnosticando e diferenciando indivíduos puros e híbridos.

Assim, mais trabalhos são necessários para otimizar os resultados, assim como o alinhamento e obtenção dos *primers* necessários para a aplicação da técnica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, Jonas da Paz. IDENTIFICAÇÃO E VARIAÇÃO GENÉTICA DE *Colossoma macropomum* E SEUS HÍBRIDOS, NATIVOS E DE CATIVEIROS DA REGIÃO OESTE DO PARÁ. **Dissertação mestrado**. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Santarém, PA, 2012.
- BECHERER, Lisa et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence-specific detection. **Analytical Methods**. v. 12, p. 717–746, 2020.
- BUT, Grace Wing-Chiu et al. Rapid detection of CITES-listed shark fin species by loop-mediated isothermal amplification assay with potential for field use. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2020.
- CHAOUCH, Melek. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An effective molecular point-of-care technique for the rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. **Medical virology**, v. 31, Issue 6, p. , 2020.
- de PAULA, Tassiana Gutierrez et al. Degree of piRNA sharing and Piwi gene expression in the skeletal muscle of *Piaractus mesopotamicus* (pacu), *Colossoma macropomum* (tambaqui), and the hybrid tambacu. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**. v. 264, 111120, 2022.
- FANTINATTI, Bruno E. A.; PEREZ, Erika S.; ZANELLA, Bruna T. T.; et al. Integrative microRNAome analysis of skeletal muscle of *Colossoma macropomum* (tambaqui), *Piaractus mesopotamicus* (pacu), and the hybrid tambacu, based on next-generation sequencing data. **BMC Genomics**, v. 22, n. 237, 2021.

- FAVARATO, Ramon Marin. Mapeamento cromossômico comparativo de serrasalmídeos (Serrasalmidae, Characiformes) por meio de sequências repetitivas de DNA. **Tese de Doutorado**. Programa de Pós Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, AM, 2019.
- GARIBYAN, Lilit & AVASHIA, Nidhi. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). **J Invest Dermatol**. 133(3): e6, 2013.
- GREEN, Michael R. and SAMBROOK, Joseph. Polymerase Chain Reaction. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. 2019.
- HASHIMOTO, Diogo Teruo. Aplicação de marcadores moleculares no monitoramento genético de programas de hibridação interespecífica em pisciculturas brasileiras. **Tese de Doutorado**. Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, SP, 2011a.
- HASHIMOTO, Diogo Teruo et al. Molecular diagnostic methods for identifying Serrasalmid fish (Pacu, Pirapitinga, and Tambaqui) and their hybrids in the Brazilian aquaculture industry. **Aquaculture**, v. 321, Issues 1–2, p 49-53, 2011b.
- HASHIMOTO, Diogo Teruo et al. Interspecific fish hybrids in Brazil: management of genetic resources for sustainable use. **Reviews in Aquaculture**, v. 4, p. 1-11, 2012.
- HASHIMOTO, Diogo Teruo et al. Detection of post-F1 fish hybrids in broodstock using molecular markers: Approaches for genetic management in aquaculture. **Aquaculture Research**, v. 44, n. 6, p. 876-884, 2013.

HILSDORF, Alexandre Wagner Silva et al. The farming and husbandry of *Colossoma macropomum*: From Amazonian waters to sustainable production. **Reviews in Aquaculture**. Early View, 2021.

IBGE, Produção da Pecuária Municipal 2020; Rio de Janeiro: IBGE, 2021.

KASHIR, Junaid; YAQINUDDIN, Ahmed. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19. **Medical hypotheses**, v. 141, p. 109786, 2020.

LI, Yanmei et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a novel rapid detection platform for pathogens. **Microbial pathogenesis**, v. 107, p. 54-61, 2017.

LIMA, Felipe Pontieri de Lima; MOURÃO, Andrea; NOBILE, Andre; FREITAS-SOUZA, Diogo; FORESTI, Fausto; OLIVEIRA, Claudio; PORTO-FORESTI, Fábio. Occurrence of serrasalmidae hybrid fish in the amazon river basin, Brazil. **Oecologia Australis**, 23. 10.4257/oeco, 2018.

MACIEL, H. M. .; ARAÚJO, A. F. .; DENTZ, B. A. V. .; LIRA, K. C. da S.; SIGNOR, A. A. Stocking density of native fish and their hybrids reared in net tanks. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 10, p. e225101018591, 2021.

MARTINS, Diego Galetti. Genética aplicada no estudo da cadeia produtiva de serrasalmídeos: identificação de espécies e híbridos comercializados. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, SP, 2017.

MASTROCHIRICO-FILHO, Vito Antonio. Análise de parentesco e variabilidade genética de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) por meio de marcadores SNPs: subsídios para o melhoramento genético. **Dissertação de Mestrado**. Centro de Aquicultura da UNESP-CAUNESP, Universidade Estadual Paulista, SP, 2016.

- MASTROCHIRICO-FILHO, Vito Antonio et al. Development of a multi-species SNP array for serrasalmid fish *Colossoma macropomum* and *Piaractus mesopotamicus*. **Scientific Reports**. v. 11, 19289, 2021.
- MIA, M. Y.; TAGGART, J. B.; GILMOUR, A. E. et al. Detection of hybridization between Chinese carp species (*Hypophthalmichthys molitrix* and *Aristichthys nobilis*) in hatchery broodstock in Bangladesh, using DNA microsatellite loci. **Aquaculture**, 247:267-273, 2005.
- MORI, Yasuyoshi et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development. **Journal of infection and chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy**, vol. 19,3, p. 404-11, 2013.
- MULLIS, Kary B. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. **Scientific American**. v. 4, p. 56-61, 64-5, 1990.
- NOTOMI, Tsugunori et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 12, p. e63-e63, 2000.
- sem autor: PACU (*Piaractus mesopotamicus*). **Klimanaturali.org**, 2011. Disponível em: <<http://www.klimanaturali.org/2011/06/pacu-piaractus-mesopotamicus.html>>. Acesso em: 22/02/2022.
- PALUMBI, Stephen R. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. **Molecular systematics**, p. 205-247, 1996.
- PRADO, Fernanda Dotti. Marcadores moleculares na identificação de híbridos e introgressão genética em populações de *Pseudoplatystoma corruscans* E *Pseudoplatystoma*

reticulatum. **Tese de doutorado**. Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, SP, 2014.

PRADO, Fernanda Dotti do et al. Hybridization and genetic introgression patterns between two South American catfish along their sympatric distribution range. **Hydrobiologia**, v. 788, n. 1, p. 319-343, 2017.

Reação em cadeia da polimerase. In: WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2021. Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Rea%C3%A7%C3%A3o_em_cadeia_da_polimerase&oldid=62176935>. Acesso em: 4 out. 2021.

SATO, Lucas Seiti. INDUÇÃO À TRIPLOIDIA NO TAMBACUI *Colossoma macropomum*, PACU *Piaractus mesopotamicus* E O RESPECTIVO HÍBRIDO TAMBACU. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, Jaboticabal, SP, 2015.

SRIPHAIROJ, Kednapat; NA-NAKORN, Uthairat; KLINBUNGAC, Sirawut. Species identification of non-hybrid and hybrid Pangasiid catfish using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Agriculture and Natural Resources**. v. 52, p. 99-105, 2018.

COSTA, William. Tambacu e tambatinga: conheça dois peixes híbridos criados a partir do tambaqui da Amazônia. **Portal Amazônia**, 2021. Disponível em: <<https://portalamazonia.com/amazonia/tambacu-e-tambatinga-conheca-dois-peixes-hibridos-criados-a-partir-do-tambaqui-da-amazonia>>. Acesso em: 23/02/2022.

VAL, Adalberto L. & OLIVEIRA, Alzira M. de. *Colossoma macropomum*—A tropical fish model for biology and aquaculture. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**. v. 335, Issue 9-10, 2021.

XIONG, Xiong et al. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) identification in processed fish products using loop-mediated isothermal amplification and polymerase chain reaction assays. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 13, p. 4696-4704, 2020.

XIONG, Xiong et al. Tracing Atlantic Salmon (*Salmo salar*) in Processed Fish Products Using the Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) and PCR Assays. **Food Analytical Methods**, p. 1-11, 2020.

XIONG, Xiong et al. Using real time fluorescence loop-mediated isothermal amplification for rapid species authentication of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 95, p. 103659, 2021.