

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

ANA LUIZA CHAVES LEIN

**Amplificação isotérmica mediada por *loop* para identificação de
espécies de peixes**

BAURU
2022

ANA LUIZA CHAVES LEIN

**Amplificação isotérmica mediada por *loop* para identificação de
espécies de peixes**

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

L531a Lein, Ana Luiza Chaves
 Amplificação isotérmica mediada por loop
 para identificação de espécies de peixes / Ana
 Luiza Chaves Lein. -- Bauru, 2022
 62 p.

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

 1. LAMP. 2. Autenticação alimentar. 3.
 Piscicultura de híbridos. I. Título.

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



Laboratório de
Genética de Peixes
Unesp Bauru



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)

AGRADECIMENTOS

O meu agradecimento é estendido à instituição e pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

A Deus, por ser o motivo do meu viver e por ter me sustentado em amor sempre.

Ao meu noivo, Ivanio, meu amor, meu parceiro, que esteve comigo durante todos os momentos, para me alegrar e me ajudar.

Aos meus pais, Verônica e Garibaldi, minha irmã, Ana Laura, minha família e amigos por sempre me apoiarem e me incentivarem a seguir os meus sonhos.

Aos meus amigos de Bauru que são muito mais que amigos, se tornaram minha família, Tafnes, Mani, Emilyn, Heitor, Giulia, Bruna, Karen, Nathalia e Rodrigo.

Aos meus amigos da graduação, que estiveram próximos de todo o processo, Laura, Eleonora, Chelsea, Thalissa, Heidi, especialmente à Natália, minha parceira e companheira do laboratório que me ajudou e me amparou em tudo o que eu precisei.

À Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista, campus Bauru, e ao departamento de Ciências Biológicas, pela estrutura e condições oferecidas para a realização deste trabalho e pela contribuição para minha formação acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio concedido.

Ao meu professor Fábio Porto-Foresti, por ter confiado em mim e me dado a oportunidade de fazer parte do laboratório e por ter me ensinado e me apoiado com muita paciência e atenção durante todo o meu percurso.

Ao meu coorientador, Caio Felipe, que sempre esteve de perto me ensinando e me capacitando a desenvolver meus projetos e pesquisas com muita paciência e carinho.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Genética de Peixes (UNESP - Bauru), que me acolheram desde o meu segundo ano da graduação e me proporcionaram enorme aprendizado e crescimento pessoal, Carolina, Caio Goes, Gabriela, Yasmin, Raissa, Rafael, Henrique, Zeni, Leonardo e Milan.

Aos pesquisadores, Fernanda e Ricardo, por toda a ajuda e ensinamentos.

RESUMO

A Amplificação Isotérmica Mediada por *loop* (LAMP) é uma técnica molecular que 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 sua utilização é mais complexo do que de *primers* para PCR, pois são seis pares específicos que reconhecem até seis sequências distintas do DNA alvo. Ela possibilita a identificação de espécies e permite uma análise rápida, precisa e de baixo custo, utilizando temperatura constante (de 60 a 65°C) por cerca de 30 minutos. A técnica dispensa o uso de equipamentos caros, o que amplia e facilita sua utilização nas análises moleculares em campo e em outras aplicações. A identificação precisa e rápida de espécies de peixes através da LAMP permite o diagnóstico e análises objetivas, para as problemáticas de piscicultura de híbridos, bem como da autenticação de produtos processados de peixes mesmo em ambientes com pouca infraestrutura. O objetivo do trabalho foi padronizar e otimizar ensaios de LAMP para amostras de *Pangasianodon hypophthalmus* e *Piaractus mesopotamicus* submetidas a extração de DNA genômico, em comparação com amostras processadas por *Cell lysis solution* e amostras de tecido *in natura*, por meio de marcadores moleculares. Foi feito o isolamento, *design* e aplicação dos três pares de *primers*, bem como a otimização do ensaio LAMP de ambas as espécies e a aplicação de genes como marcadores moleculares (citocromo b e RAG2) por PCR convencional nas amostras submetidas aos diferentes processamentos. Foram obtidos 6 *primers* para *P. hypophthalmus* e 5 para *P. mesopotamicus*, cujas especificidades foram testadas pelo ensaio LAMP, através da visualização a olho nu da mudança de coloração nos tubos. Os resultados demonstraram que, de maneira geral, os *primers* LAMP obtidos para *P. mesopotamicus* podem ser espécie-específicos e os para *P. hypophthalmus* não, pois houve amplificação cruzada com amostras de DNA de outras espécies. Além disso, as amostras de tecido *in natura* e as processadas por *Cell lysis solution* apresentaram presença de produtos de amplificação em ambas as espécies, comparável às amostras de DNA extraído, o que confirma a possibilidade de utilização de amostras não submetidas à extração de DNA genômico em reações LAMP futuras. Portanto, o presente estudo descreve a aplicação dessa metodologia de identificação de espécies de peixes como mais uma ferramenta genética para estudos aplicados à aquicultura, relacionados à orientação de programas de conservação e ao manejo adequado de plantéis reprodutores naturais e cultivados, bem como ao monitoramento da autenticidade genética na produção e comércio de produtos de peixes.

Palavras-chave: LAMP; Autenticação alimentar; Piscicultura de híbridos

ABSTRACT

The Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) is a molecular technique that has been widely used in several biological research fields, due to its efficient use in species identification. The design of its core and loop primers for the amplification is rather more complex than that of the PCR primer design, because there are six specific pairs for the identification of six distinct sequences in the target DNA. It does not require expensive equipment, such as thermal cyclers, and the reaction can be incubated in water baths, which expands and facilitates its use in field molecular analysis for on-site species identity tests, and other applications, for it enables species identification and allows a rapid, precise and low-cost analysis, under isothermal conditions (60 – 65°C), for approximately 30 minutes. The precise and rapid identification of fish species through LAMP allows objective diagnosis and analysis in the aquaculture of fish hybrids, such as in processed food products authentication, even in places with low infrastructure. The aim of this study was to standardize and optimize LAMP assays for *Pangasianodon hypophthalmus* and *Piaractus mesopotamicus* samples of extracted DNA, in comparison with samples processed only by Cell lysis solution, as well as in *natura fish* tissue, through the use of molecular markers. The three pairs of LAMP primers were isolated, designed and applied and the optimization of the assay was performed for both species, as well as the use of genes as molecular markers in a standard PCR reaction, in the samples processed by different techniques. Six primers for *P. hypophthalmus* and five for *P. mesopotamicus* were obtained and their specificity was tested by LAMP assays, through the visualization of color change in the tubes. The results showed that, generally, the LAMP primers obtained for *P. Mesopotamicus* may be species-specific, although the ones for *P. hypophthalmus* are not, because there was cross reaction with DNA samples of other species. Besides that, the samples of *in natura* tissue and the ones processed by Cell lysis solution showed presence of amplification products in both species comparable to the ones of extracted DNA, which confirms the possibility of using such samples in further LAMP reactions. So, the present study describes the application of this fish species identification methodology as one more tool for genetic studies applied to aquaculture, regarding the orientation of conservation programs and the adequate management of natural and cultivated reproductive stocks, as well as to genetic authenticity monitoring of the production and trade of fish products.

Keywords: LAMP; Food authentication; Hybrids aquiculture

SUMÁRIO

1	1 INTRODUÇÃO	11
1.1	Descrição da técnica Amplificação Isotérmica Mediada por <i>Loop</i> (LAMP)	11
1.2	Vantagens e limitações da técnica LAMP	20
1.3	Aplicações da técnica LAMP	22
1.3.1	Identificação de patógenos humanos e animais	22
1.3.2	Aplicações em plantas	25
1.3.3	Identificação de espécies de animais	25
1.4	Reações LAMP em amostras com processamento simplificado	27
1.5	Considerações sobre as espécies modelo	29
1.5.1	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	29
1.5.2	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	30
2	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivos gerais	31
2.2	Objetivos específicos	31
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	Obtenção das amostras biológicas	32
3.2	Extração do DNA genômico	32
3.3	Processamento das amostras de tecido	33
3.4	Amplificação dos genes Citocromo b e RAG por PCR convencional	34
3.5	Otimização do ensaio LAMP para a amplificação dos genes Citocromo b e RAG2	36
4	RESULTADOS	37
4.1	Obtenção dos <i>primers</i> espécie-específicos	37
4.1.1	Obtenção dos <i>primers</i> PCR e LAMP para <i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	38
4.1.2	Obtenção dos <i>primers</i> LAMP para <i>Piaractus mesopotamicus</i>	40
4.2	Análise por LAMP para identificação das amostras	42
4.2.1	Amostras de <i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	43
4.2.2	Amostras de <i>Piaractus mesopotamicus</i>	46

5	DISCUSSÃO	49
5.1	Marcadores de LAMP e PCR convencional na identificação de <i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	50
5.2	Marcadores de LAMP e PCR convencional na identificação de <i>Piaractus mesopotamicus</i>	53
5.3	Análise molecular das amostras com processamento simplificado	55
	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Descrição da técnica Amplificação Isotérmica Mediada por *Loop* (LAMP)

A reação de amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP) é uma técnica que amplifica fragmentos com alta especificidade, eficiência e rapidez, sob condições isotérmicas, por um mecanismo de deslocamento de fitas (*strand-displacement*). Foi desenvolvida em 1998 por uma empresa japonesa chamada Eiken Chemical Co., Ltd. e proposta pela primeira vez em 2000 por Notomi et al. A técnica consiste na síntese de DNA por autociclagem, que é realizada pela enzima Bst (enzima isolada de *Bacillus stearothermophilus* com atividade de polimerase e transcriptase reversa) com alta atividade de separação de fitas e um conjunto de dois pares de *primers*: internos, *forward inner primer* (FIP) e *backwards inner primer* (BIP), e externos, *forward 3* (F3) e *backwards 3* (B3), desenhados para reconhecer, de maneira altamente específica, seis sequências distintas no DNA alvo, sob uma temperatura constante de 65°C na maioria dos protocolos (Figura 1). (CHAOUCH, 2020; NAGAMINE; HASE; NOTOMI, 2002; NOTOMI et al., 2000; SOROKA; WĄSOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021).

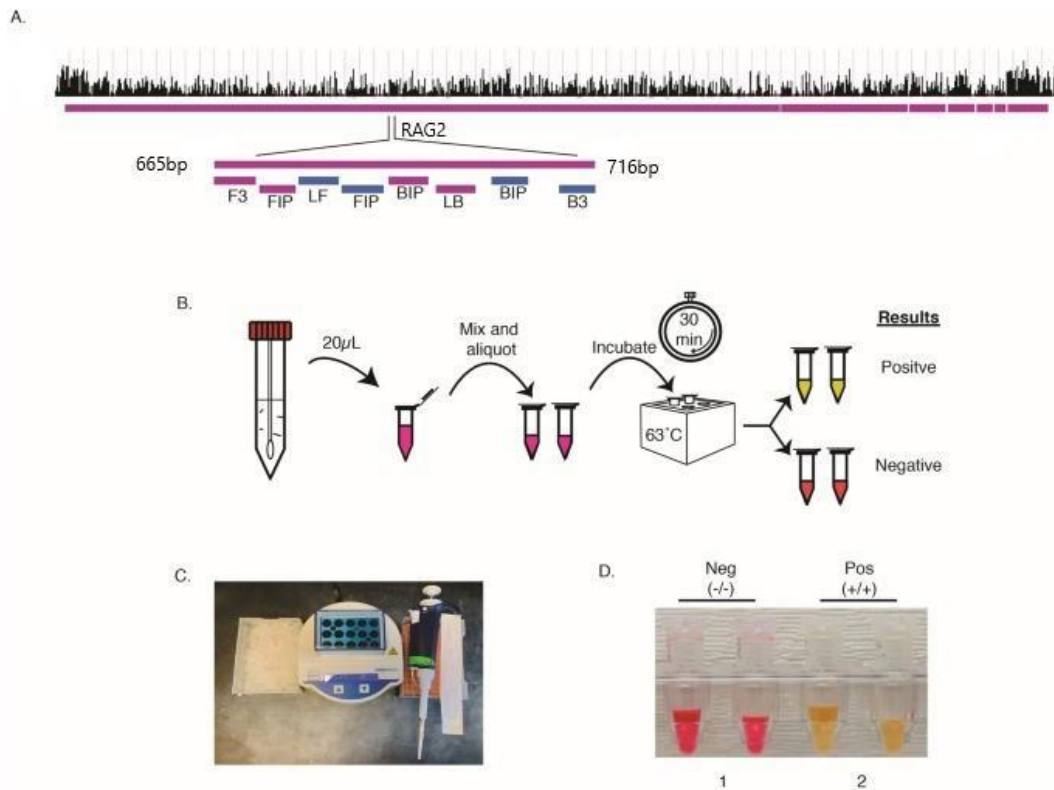


Figura 1: Representação esquemática do ensaio LAMP. **Fonte:** Soroka; Wąsowicz; Rymaszewska (2021) e adaptado pela autora.

Os *primers* da LAMP são complexos, altamente específicos e se anelam a sequências em diferentes regiões ao longo do DNA alvo (Figura 2). O *forward inner primer* (FIP) e o *backwards inner primer* (BIP) são longos (de 45 a 49 pares de bases) e formados por duas sequências distintas que correspondem às sequências senso e antisenso do DNA alvo, sendo que o FIP contém a sequência F1c (complementar à F1) e a F2 (complementar à F2c), espaçadas por uma sequência TTTT; e o BIP, a sequência B1c (complementar à B1), o espaçador TTTT e a B2 (complementar à B2c). Os *primers* externos são as sequências F3 (complementar à F3c) e B3 (complementar à B3c), que são mais curtas (de 21 a 24 pares de bases) e aplicadas em concentrações menores na reação, para que elas flanqueiem a região alvo mais lentamente do que os *primers* internos (NAGAMINE; HASE; NOTOMI, 2002; NOTOMI et al., 2000; SOROKA; WĄSOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021). As características dos *primers* internos são as responsáveis pela maior especificidade da técnica (NOTOMI et al., 2015).

A reação é dividida em três momentos: (1) produção inicial do alvo; (2) ciclagem e amplificação e (3) alongação e reciclagem (Figura 3). Ela se inicia pela adição da enzima Bst e ação do *primer* interno FIP, que se anela à região F2c do DNA alvo e inicia a síntese da fita complementar (Figura 5, passo 1). Em seguida, o *primer* externo F3 se hibridiza à região F3c no alvo e inicia a síntese de uma nova fita, o que acarreta na separação das duas fitas anteriores (Figura 5, passos 2 e 3), com a liberação de uma delas acoplada ao FIP, resultando na formação de uma estrutura em *loop* em uma das suas pontas (Figura 5, passo 4). Depois, o mesmo processo acontece com os *primers backwards* BIP e B3 (Figura 5, passo 4 e 5). Após a ação desses quatro *primers*, o resultado é a fita de DNA com estruturas em *loop* nas duas pontas (*dumb-bell*) (Figura 5, passo 6; Figura 4). O passo final dessa etapa consiste na finalização da preparação inicial do alvo para a amplificação através da conversão da estrutura *dumb-bell* em *stem-loop*, através da ação do FIP novamente, processo que é crítico para a correta ciclagem na reação (Figura 3) (NAGAMINE; HASE; NOTOMI, 2002; NOTOMI et al., 2000).

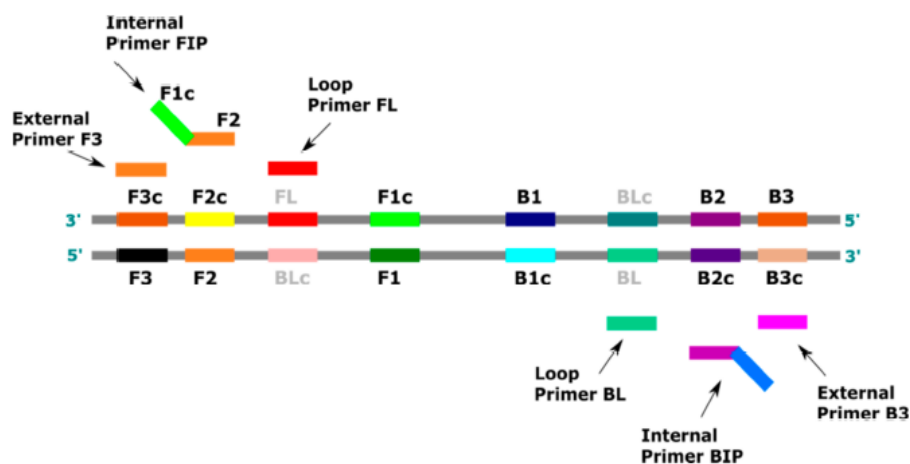


Figura 2 Nomenclaturas das seis regiões alvo na fita 3'5' do DNA alvo, três *forward* (F3c; F2c e F1c) e três *backward* (B1; B2 e B3), bem como suas regiões complementares na fita 5'3' e representação esquemática dos *primers* da LAMP. Os *primers* internos FIP e BIP são compostos pelas regiões F2 e F1c, e B2 e B2c, respectivamente. Os *primers* externos se anelam às regiões F3 e B3 e os *primers loop* LF e LB entre F1c e F2c, e B1c e B2c, respectivamente. **Fonte:** Soroka, Wąsowicz e Rymaszewska (2021).

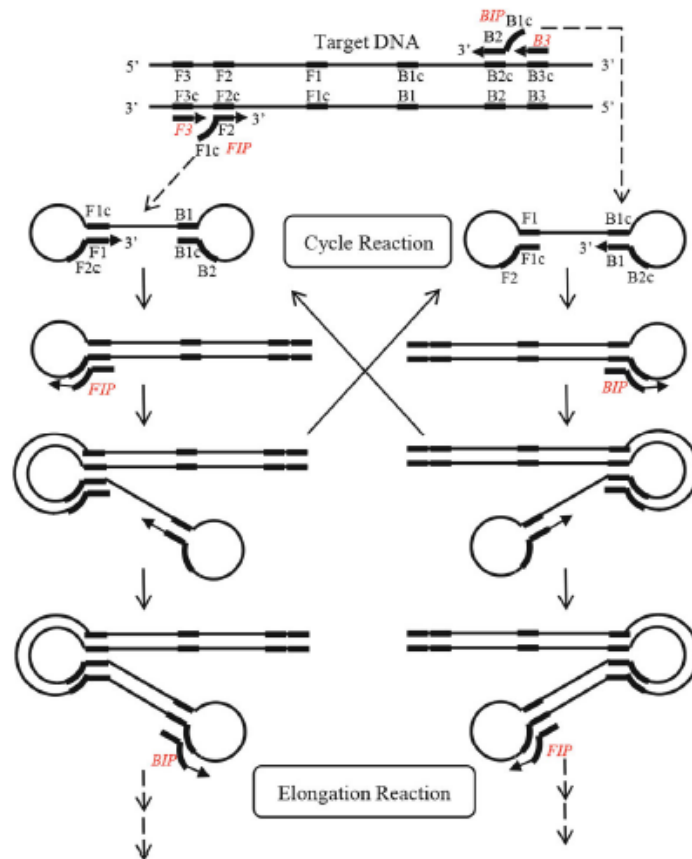


Figura 3: Representação esquemática do mecanismo da LAMP, destacando a etapa de produção inicial do alvo (“target DNA”), a de ciclagem e amplificação (“cycle reaction”) e a de elongação e reciclagem (“elongation reaction”). **Fonte:** Notomi et al. (2015).



Figura 4: Representação esquemática da estrutura de fita simples de DNA em *dumb-bell*. Um template artificial utilizado na primeira etapa da LAMP. **Fonte:** Soroka, Wąsowicz e Rymaszewska (2021).

I. Starting material producing step

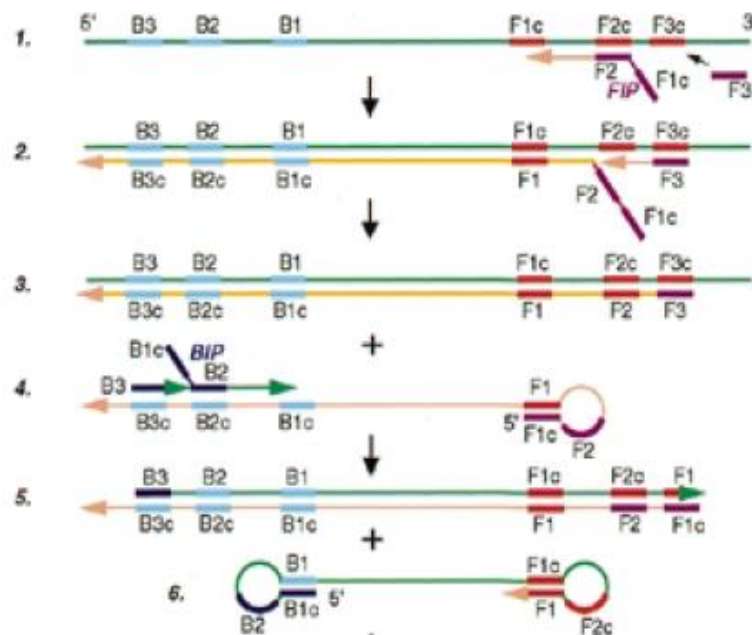


Figura 5: Representação esquemática do mecanismo da etapa de produção inicial do alvo da reação LAMP. **Fonte:** Notomi, et al. (2000).

As estruturas de DNA alvo em *stem-loop* são as que iniciam a segunda etapa da reação, a de ciclagem e amplificação, por meio da hibridação do FIP com a região do *loop*. Nesse momento, o FIP se anela à porção fita simples da estrutura *stem-loop* e dá início a uma nova síntese, liberando a fita gerada anteriormente, que, por sua vez, forma uma nova estrutura *stem-loop*, que dá continuidade ao processo. Mais adiante, de forma semelhante, o BIP se anela à região alvo e também continua a amplificação (NAGAMINE; HASE; NOTOMI, 2002; NOTOMI et al., 2000; 2015).

No terceiro momento, da elongação e reciclagem, as reações de síntese por deslocamento de fitas são novamente mediadas pela Bst, a partir dos *stem-loop* e são sequencialmente repetitivas, exponencialmente produzindo inúmeros produtos de amplificação. Os produtos finais não são cópias lineares de fita dupla ou simples do alvo, são de diferentes proporções, uns são estruturas *stem-loop* de DNA e outros são mais complexos, estruturas compostas por vários *loops* que se formam pelo anelamento de sequências copiadas invertidas

na mesma fita (estruturas em “formato de couve-flor”) (Figura 6). Posteriormente, para as análises, fragmentos de DNA fita-simples podem ser isolados desses produtos (NAGAMINE; HASE; NOTOMI, 2002; NOTOMI et al., 2000; 2015; SOROKA; WĄSOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021).

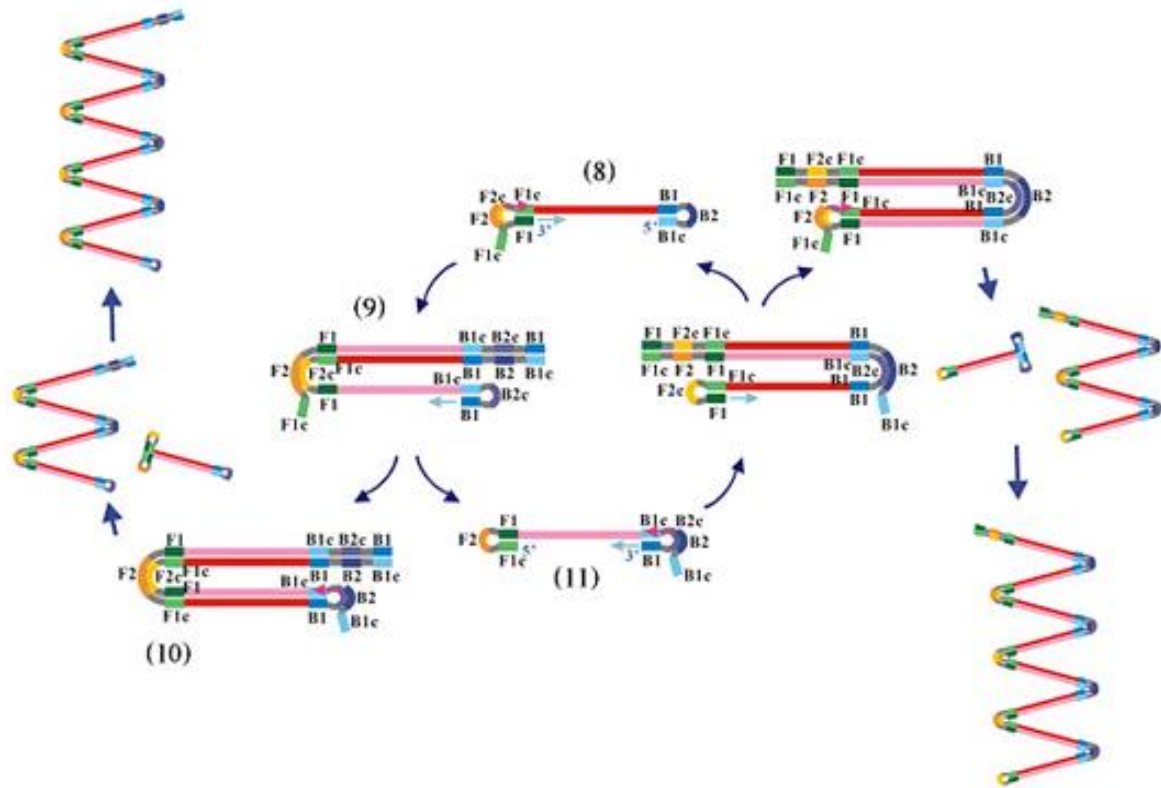


Figura 6: Representação esquemática das etapas 2 e 3 da LAMP, com destaque para os produtos de amplificação de diferentes tamanhos e estruturas que são produzidos. **Fonte:** Eiken Chemical Co., Ltd (2005).

Como a reação inteira acontece de forma isotérmica, não há a etapa de desnaturação da fita, sendo essa função realizada pela enzima Bst, que realiza a desnaturação de uma fita enquanto outra é formada, sem a necessidade de elevar a temperatura a 95°C. Esse e outros fatores permitem com que a LAMP seja extremamente eficaz e rápida, quando comparada com a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), por exemplo; em menos de 1 hora, os ciclos da reação acumulam 10⁹ cópias da sequência alvo, uma vez que o produto de um ciclo serve como

substrato para a geração de novos produtos; enquanto que, na PCR, são produzidos cerca de um milhão (10^6) de cópias. Pelo fato de a reação reconhecer o DNA alvo inicialmente por seis sequências e, nos estágios mais posteriores, por quatro sequências, é esperado que a amplificação seja de alta seletividade (NAGAMINE; HASE; NOTOMI, 2002; NOTOMI et al., 2000; SOROKA; WAŚOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021; XIONG et al., 2021b).

Posteriormente, um segundo trabalho, de Nagamine, Hase e Notomi (2002), apresentou uma alternativa acelerada da LAMP, que reduz o tempo da reação ainda mais, para trinta minutos, através da adição de mais um par de *primers* ao protocolo, os *primers loop forward* (LF) e *backwards* (LB), que reconhecem mais duas sequências distintas do DNA, além das seis anteriores reconhecidas pelos *primers core* (internos e externos). O *primer* LF flanqueia a região entre F2 e F1, na direção F1 e F2, e o LB entre B1 e B2 (Figura 2; figura 7). Esses dois *primers* extra se hibridizam às estruturas *stem-loop* que não sofreram ação dos *primers* internos e iniciam mais uma etapa de síntese de DNA por *strand-displacement*, durante a terceira etapa da reação, a de alongação e reciclagem. Mais adiante, esses *primers* são ativados apenas uma vez quando novas estruturas artificiais são criadas, um fator que aumenta a seletividade da reação (SOROKA; WAŚOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021).

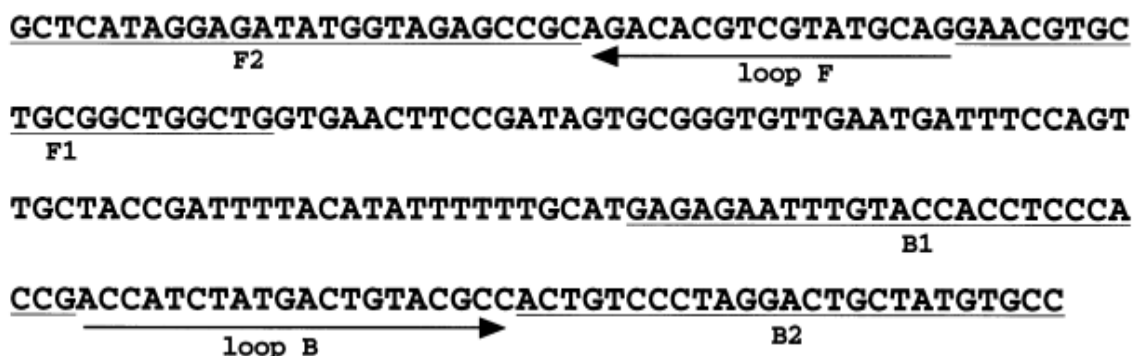


Figura 7: Sequências de nucleotídeos do DNA alvo evidenciando a região de anelamento dos *primers loop forward* (loop F) e *backward* (loop B). **Fonte:** Nagamine, Hase e Notomi (2002).

Dessa maneira, a reação padrão da LAMP utilizada nos trabalhos mais recentes é a alternativa acelerada de Nagamine, Hase e Notomi (2002), que consiste na repetição de dois tipos de alongação: (1) auto-elongação a partir das estruturas em *stem-loop* e (2) anelamento dos *primers* LF e LB e alongação na região do *loop* (NOTOMI et al., 2015; SOROKA; WAŚOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021).

Com o avanço das pesquisas e aumento do interesse na técnica, foram desenvolvidas algumas variações, como a Amplificação Isotérmica Mediada por *Loop* de Transcrição Reversa (RT-LAMP) (possibilitada pela ação da enzima Bst) para sequências de RNA; a LAMP multiplex e a LAMP com visualização em *real-time* (com alteração do protocolo original) (CHAOUCH, 2020; NOTOMI et al., 2000; 2015; SOROKA; WAŚOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021).

A detecção de seus produtos é relativamente simples e se utiliza de métodos comuns à outras técnicas de amplificação, como por turbidez (Figura 8), colorimetria, fluorescência (corantes SYBR Green e EvaGreen) e, também, por visualização *real-time*, isso devido à alta especificidade e grande quantidade de produtos gerados pela reação. O resultado pode ser observado logo após a reação e até enquanto a reação está acontecendo, sem nenhum procedimento adicional, sendo, no entanto, mais indicada a observação após um curto período de descanso à temperatura ambiente (KUNDAPUR; NEMA, 2016; NOTOMI et al., 2015; MORI; NOTOMI, 2009; SOROKA; WAŚOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021).

Não há a necessidade da separação dos produtos por eletroforese com gel de agarose, com a utilização de corantes artificiais, no entanto, é possível utilizá-la para visualização. Em contraste com a PCR, os produtos da LAMP formam bandas de diferentes tamanhos e pesos moleculares, pois seus produtos são estruturas variadas (Figura 9). Essa é uma alternativa mais lenta e desgastante, com a possibilidade de contaminação cruzada das amostras, pela grande quantidade de *amplicons* gerados, não sendo, portanto, o método de detecção mais

recomendado (CHAOUCH, 2020; NOTOMI et al., 2000; 2015; SOROKA; WĄSOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021).

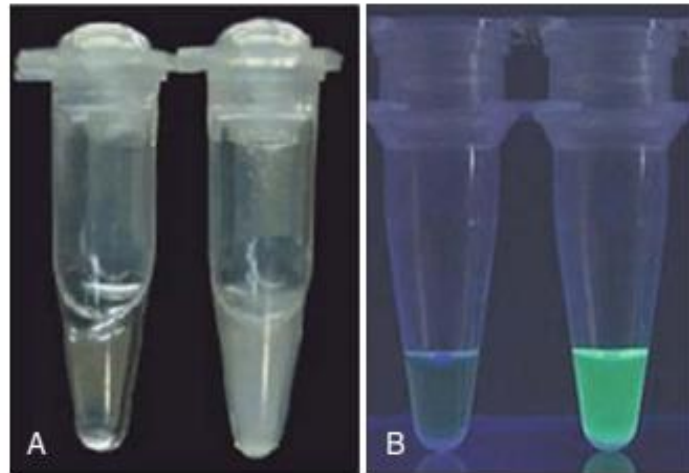


Figura 8: Exemplo de detecção de produtos LAMP por visualização a olho nu. (A) Detecção por turbidez: tubo da esquerda transparente, ausência de produto (negativo) e tubo da direita opaco, presença de produto (positivo). (B) Detecção por fluorescência: tubo da esquerda, ausência de produto (negativo) e tubo da direita fluorescente, presença de produto (positivo). **Fonte:** Mori e Notomi (2009).

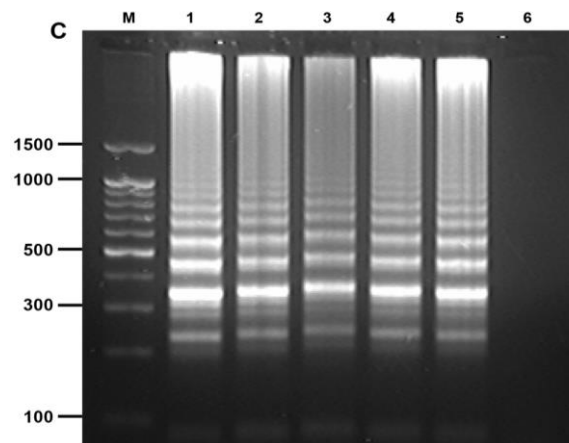


Figura 9: Exemplo de uma eletroforese em gel de agarose de amostras de DNA amplificado por LAMP. **Fonte:** Rahman et al. (2017).

A visualização qualitativa por turbidez é a mais simples e rápida. Um produto residual da LAMP é o pirofosfato de magnésio ($Mg_2P_2O_7$), gerado enquanto os nucleotídeos são adicionados à nova cadeia de DNA sintetizada e depositado em suspensão ou sedimentado na solução da reação, possibilitando, assim, a sua visualização a olho nu. Portanto, se o tubo está

opaco, houve a formação do produto residual, indicando presença de amplificação, enquanto que um tubo transparente, indica ausência de reação (Figura 8). Para uma visualização quantitativa, é possível o pareamento com análises *real-time* (MORI; NOTOMI, 2009; SOROKA; WAŚOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021; XIONG et al., 2020).

O maior número de *primers* e regiões reconhecidas no DNA alvo são as características marcantes que definem a alta sensibilidade da LAMP em reconhecer um mínimo de seis cópias de DNA em toda a mistura da reação. Além disso, é observada também uma maior resistência a *backgrounds* (fragmentos de DNA irrelevantes e agentes inibidores de reação), o que reduz as limitações em relação às outras técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (CHAOUCH, 2020; KUNDAPUR; NEMA, 2016; NOTOMI et al., 2000; SOROKA; WAŚOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021). Além disso, os resultados apresentados por Nagamine, Hase e Notomi (2002) sugerem que a LAMP acelerada pelo uso de *loop primers* aumenta ainda mais a sensibilidade da reação.

1.2 Vantagens e limitações da técnica LAMP

A técnica LAMP é relativamente nova e apresenta uma série de vantagens para usos diversos em biologia molecular, comparado a outras técnicas de amplificação. Os motivos pelos quais ela atrai muito a atenção de pesquisadores de diversas áreas são: a reação pode ser realizada em qualquer laboratório de biologia molecular, com uso de equipamentos simples (como banho-maria ou banho seco, dispensando o uso de equipamentos caros, como termocicladores); tem duração de alguns minutos; com alta sensibilidade e seletividade da amplificação; não requer um *template* de DNA desnaturado para a amplificação; é menos sensível a inibidores de reação que a PCR; requer apenas uma enzima para a síntese de DNA e

a detecção dos produtos pode ser feita a olho nu (CHAOUCH, 2020; MORI; KANDA; NOTOMI, 2013; NAGAMINE; HASE; NOTOMI, 2002; NOTOMI et al., 2000, 2015; SOROKA; WĄSOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021; XIONG et al., 2021b). Além disso, em teoria, raramente há a produção de produtos não específicos por meio da LAMP acelerada (NAGAMINE; HASE; NOTOMI, 2002). A técnica é especialmente vantajosa para trabalhos de campo e diagnósticos *point-of-care* ou em hospitais, devido à sua velocidade e tempo reduzido de reação (MORI; KANDA; NOTOMI, 2013; NAGAMINE; HASE; NOTOMI, 2002; NOTOMI et al., 2015; SOROKA; WĄSOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021; XIONG et al., 2021b).

Diante dessas vantagens, sua principal limitação está relacionada ao desenho dos seis *primers* espécie-específicos (KASHIR; YAQINUDDIN, 2020; NAGAMINE; HASE; NOTOMI, 2002; NOTOMI et al., 2000, 2015; XIONG et al., 2021b), que devem seguir rigorosos critérios de otimização: concentração; localização dos pares de nucleotídeos; distância entre regiões do DNA e os *primers* devem apresentar estrutura de fita simples a 60 - 65°C, sem criarem uma fita dupla. Esses detalhes requerem atenção, porque o uso de múltiplos pares de *primers* para amplificar a mesma sequência pode aumentar o número de interações entre eles. Além disso, dependendo do alvo da pesquisa, para a escolha correta dos *primers*, deve ser feita uma análise entre a sequência selecionada e outras de organismos e espécies semelhantes e de proximidade filogenética com a espécie alvo, para verificar regiões flanqueadoras adequadas. Para isso, há disponíveis *softwares* próprios de suporte que simplificam o *design* apropriado dos *primers* (NOTOMI et al., 2015; SOROKA; WĄSOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021; XIONG et al., 2020; 2021).

Uma outra limitação da técnica reside no fato de que, apesar de ser uma excelente ferramenta diagnóstica, seus produtos de amplificação não podem ser aproveitados para futuras análises, como clonagem e sequenciamento, como os da PCR (KASHIR; YAQINUDDIN,

2020; KUNDAPUR; NEMA, 2016; NOTOMI et al. 2002; 2015; SOROKA; WĄSOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021). Também requer atenção a sua sensibilidade a possíveis contaminações cruzadas, por exemplo por partículas contidas no ar (KUNDAPUR; NEMA, 2016).

1.3 Aplicações da técnica LAMP

Essa técnica é excelente para aplicações que demandam velocidade, tolerância a inibidores e baixo custo e os esforços extensivos em pesquisas de base dessa técnica contribuíram e facilitaram o seu uso em diversas aplicações, como em trabalhos de campo; *point-of-care testing* na detecção de patógenos em cenários clínicos e identificação de espécies para o monitoramento genético de produtos alimentares comercializados e de amostras ambientais (CHAOUCH, 2020; KUNDAPUR; NEMA, 2016; NAGAMINE; HASE; NOTOMI, 2002; NOTOMI et al., 2015; SOROKA; WĄSOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021).

Atualmente, há inúmeros trabalhos desenvolvidos com o uso da LAMP como técnica de amplificação e esse número vem crescendo, principalmente nos últimos anos, devido à pandemia da Covid19, pois é um método de diagnóstico da infecção pelo SARS-Cov-2 (MORI; KANDA; NOTOMI, 2013; REF). As possíveis aplicações da LAMP excedem o escopo deste trabalho, todavia, nos próximos subtópicos serão exploradas algumas das mais relevantes.

1.3.1. Identificação de patógenos humanos e animais

Desde o desenvolvimento da técnica LAMP, foram padronizadas reações específicas para a identificação de diversos patógenos para o diagnóstico de doenças por vários grupos de pesquisas e utilizados métodos comparativos entre a LAMP e outras técnicas de amplificação, como a PCR (MORI; KANDA; NOTOMI, 2013).

Na medicina, já foram desenvolvidos uma variedade de *primers* e são utilizados kits específicos para a detecção de vírus, bactérias, fungos e parasitas humanos, como: SARS-Cov; SARS-Cov-2; vírus da Influenza; papiloma vírus humano; vírus HIV; *Mycobacterium tuberculosis*; *Escherichia coli*; *Mycoplasma pneumoniae*; *Plasmodium falciparum*; *Legionella* sp.; *Plasmodium falciparum*; *Clostridium difficile*; *Staphylococcus aureus* e *S. pneumoniae*; *Salmonella* sp. *Leishmania* sp. e *Trypanosoma brucei*. Além disso, também foram padronizados ensaios LAMP para a detecção de quatro sorotipos do vírus da dengue, vírus da encefalite japonesa e vírus do Nilo Ocidental em pacientes com infecção aguda, bem como em mosquitos vetores em seus respectivos países endêmicos (ERBER et al., 2022; KASHIR, YAQINUDDIN, 2020; LI et al., 2017; MORI; KANDA; NOTOMI, 2013; NZELU; KATO; OU et al., 2021; PETERS, 2019; SOROKA; TORRES et al., 2011; WAŚOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021).

A LAMP tem se mostrado extremamente útil no que tange ao diagnóstico das doenças tropicais negligenciadas (DTN), sendo que, das 17 reconhecidas pela OMS, 14 foram analisadas utilizando essa técnica. Desse modo, ela se apresenta como uma alternativa viável e promissora para o diagnóstico e monitoramento epidemiológico das DNTs (MORI; KANDA; NOTOMI, 2013), diante da possibilidade de sua aplicação em locais de acesso limitado a recursos em países sub-desenvolvidos ou em desenvolvimento, principalmente quando associada a um processamento simplificado das amostras (NOTOMI et al., 2015). Um exemplo muito interessante é um ensaio LAMP descrito no trabalho de Sako et al. (2013), cuja reação foi incubada em uma garrafa térmica e apresentou uma capacidade comparável de detecção da presença de *Taenia* sp. em amostras de fezes à das reações incubadas em termociclador.

Atualmente, o método referência para os testes de detecção de COVID-19 é o RT-qPCR, no entanto, a possibilidade da sua substituição pelo RT-LAMP vem sendo alvo de pesquisas e os testes desenvolvidos durante a pandemia têm se mostrado extremamente efetivos na detecção de infecções ativas. Kashir e Yaqinuddin, (2020) apontam o sucesso desses testes, que são capazes de detectar de uma a dez cópias de DNA viral na reação, sendo significativamente mais sensível que a PCR. Além disso, mais uma vez, a grande vantagem da técnica está na sua possibilidade de uso em campo e outras condições não-laboratoriais, como aeroportos, pequenos hospitais e clínicas (CHAOUCH, 2020; FOWLER et al., 2021; KASHIR; YAQINUDDIN, 2020; NAWATTANAPAIBOON et al., 2021; SOROKA; WĄSOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021).

Extrapolando a área de identificação de patógenos, no Japão foi desenvolvido um sistema de detecção molecular automatizado, utilizando RT-LAMP para detectar células cancerígenas que sofreram metástase e invadiram linfonodos em pacientes com câncer de mama (TAMAKI et al., 2009).

Sua importância na medicina veterinária está principalmente na detecção de patógenos, com destaque para doenças de importância econômica, sanitária e epidemiológica, em contextos de utilização *point-of-care* em campo e em locais com pouca infraestrutura (PADZIL et al., 2022; SOROKA; WĄSOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021). Já foram descritos na literatura veterinária ensaios para a detecção das seguintes infecções: leishmaniose visceral e cutânea (NZELU; KATO; PETERS, 2019); infecção pelo vírus da Influenza A, subtipos H1, H5, H7 e H9; circovírus; vírus da bronquite infecciosa e polyomavirus hemorrágico de gansos em aves (PADZIL et al., 2022); doença da cabeça amarela em camarões (KHUNTHONG et al., 2013); infecção por kobuvirus entérico suíno (LI et al., 2014); toxoplasmose em gatos e cães (XUE et al., 2021), entre várias outras (SOROKA; WĄSOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021).

1.3.2. Aplicações em plantas

No contexto da agricultura, a possibilidade do diagnóstico rápido e eficiente de infecções vegetais provida pela LAMP em laboratório ou em campo pode contribuir para a prevenção do espalhamento do patógeno em outras plantas saudáveis. Isso pode minimizar danos no comércio e transporte de produtos vegetais, bem como, ser aplicado no controle e monitoramento de doenças quarentenárias e não quarentenárias. Trabalhos que já foram desenvolvidos com a LAMP para a detecção de infecções virais apresentam sensibilidade de 100 até 1000 vezes maior do que reações de PCR de especificidade comparável (SOROKA; WAŚOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021). Como exemplo tem-se o ensaio LAMP desenvolvido por Ortega et al. (2019) para a detecção de infecções por *Monilinia* spp. em nectarinas.

Outro uso seria na identificação de pragas, como a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) (OSABUTEY et al., 2022), além da identificação de plantas geneticamente modificadas (PGMs), podendo serem feitas análises em campo, e na identificação de espécies de importância econômica, medicinal e ambiental (KUNDAPUR; NEMA, 2016; SOROKA; WAŚOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021).

1.3.3. Identificação de espécies animais

No contexto da conservação ambiental, a LAMP tem se mostrado bastante promissora por sua habilidade de rápida identificação de espécies. O trabalho de Suzuki et al. (2021) exemplifica isso, ao utilizá-la na identificação de uma espécie de salamandra japonesa (*Hynobius tokyoensis*) nacionalmente ameaçada de extinção, em um contexto em que a

identificação não ambígua do grupo morfológicamente muito semelhante a outros é vital para o seu manejo e conservação.

Outro exemplo se encontra no trabalho de But et al. (2020), que apresenta a LAMP como uma alternativa para uma identificação mais vantajosa das 12 espécies de tubarões listadas pela Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies Silvestres Ameaçadas de Extinção (CITES), que ainda são alvo de superexploração e correm sérios riscos de extinção. Dessa maneira, a identificação rápida e simples auxiliaria os órgãos e agentes de fiscalização a monitorar efetivamente o comércio ilegal dessas espécies, bem como nas pesquisas, para o manejo e desenvolvimento de técnicas de peixamento legais e sustentáveis (BUT et al., 2020).

A aplicabilidade da LAMP para a identificação de espécies pode ser estendida para a identificação de traços de seres vivos, o que amplia o seu uso para o comércio e investigações de autenticidade de produtos animais e vegetais comercializados (SOROKA; WĄSOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021).

Na análise desenvolvida por Yu et al. (2019), a LAMP foi utilizada para a identificação e rastreamento de produtos de peles de animais aplicadas a inspeções em campo, sendo sua alta sensibilidade, tolerância a inibidores e possibilidade de uso de amostras de DNA de menor qualidade fatores determinantes para os resultados obtidos. Nesse caso, a técnica contrasta com o PCR que é consideravelmente menos resistente a inibidores, como os pigmentos e outras substâncias utilizadas no preparo das peles para a fabricação dos produtos.

Outra aplicação importante é o uso da LAMP para testes de identificação de espécies em produtos alimentares processados. A indústria de alimentos sofre muito com fraudes e identificação cruzada de carnes e produtos processados, cenário esse que abre precedentes para métodos simples, rápidos e efetivos para identificação correta de produtos no campo para o controle de qualidade. Essa situação é prevalente em países subdesenvolvidos e em

desenvolvimento, muito populosos e com alta demanda por carnes e produtos derivados; sendo os principais alvos, os de origem suína, bovina e de peixes (ČLANJAK–KUDRA et al., 2021; RAN et al., 2016; SOROKA; WAŚOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021; TATULLI et al., 2020).

Peixes e derivados de peixe compõe 17% do consumo mundial de proteína animal e dentro desse mercado há um elevado índice de fraude através da rotulagem errada e substituição de espécies de valor mais alto por de valor mais baixo para obtenção ilegal de lucro. Essa prática trás tanto prejuízos financeiros quanto sanitários para o consumidor (ČLANJAK–KUDRA et al., 2021). Para o ambiente, uma das consequências dessas fraudes é que ela subestima e mascara a biodiversidade explorada comercialmente, o que pode conduzir a um consumo inadvertido de espécies ameaçadas (TATULLI et al., 2020; XIONG et al., 2021a).

Os principais exemplos na literatura de autenticação de alimentos derivados de peixes utilizando a LAMP são: produtos processados de salmão (*Salmo salar*) (XIONG et al., 2021b; 2020b; LI et al., 2022); de truta (*Oncorhynchus mykiss*) (XIONG et al., 2020); de atum (*Katsuwonus pelamis*) (XIONG et al., 2021a) e de bacalhau (LI et al., 2021). Dentre esses trabalhos mencionados, o de Xiong et al. (2021b) se destaca, tendo sido desenvolvido um ensaio LAMP *real time* para a detecção rápida de *Salmo salar* através de fragmento do gene mitocondrial Citocromo b, em amostras de produtos processados comercializados. Nas reações não houve amplificação cruzada com outras espécies analisadas a sensibilidade foi de detecção de um mínimo de 5 pg de DNA.

1.4 Reação LAMP em amostras com processamento simplificado

Além da alta especificidade, outro aspecto muito relevante da técnica é o fato de a enzima polimerase utilizada ser resistente a inibidores, permitindo com que haja uma

simplificação do processo de extração do DNA alvo da amostra (MORI; KANDA; NOTOMI, 2013; NOTOMI et al., 2015; SOROKA; WĄSOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021)

No caso da LAMP, há trabalhos que utilizaram técnicas alternativas à extração de DNA para a preparação das amostras. Uma vez que há enzimas polimerases que foram desenvolvidas com menor sensibilidade a inibidores e a sequências de DNA irrelevantes, sendo capazes de realizar amplificação de alta eficiência mesmo na presença deles, o que sugere a possibilidade do uso de amostras submetidas a processamentos mais simplificados e, até, sem a extração de DNA convencional (CHAOUCH, 2020; MORI; KANDA; NOTOMI, 2013; NOTOMI et al., 2000, 2015; SOROKA; WĄSOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021).

Fowler et al. (2021) descrevem o uso da LAMP para o diagnóstico efetivo de COVID-19 a partir de amostras de RNA extraído, bem como diretamente de meios de transporte de vírus (*swabs* naso e orofaríngeos) sem extração. As amostras não extraídas foram diluídas em água livre de nuclease, em um total de 5 minutos de preparação. Essa simplicidade se mostra extremamente útil para a realização de testes próximos a pacientes sintomáticos e para a triagem de pacientes assintomáticos (FOWLER et al., 2021).

No trabalho de Tatulli et al. (2020) a LAMP também foi utilizada tanto em amostras submetidas a extração convencional de DNA, quanto em outras que passaram por um protocolo de extração rápida. Dentro da problemática de autenticação de produtos processados de frutos do mar, a espécie alvo *Loligo vulgaris* foi identificada e discriminada das duas espécies próximas, *Loligo reynaudii* e *Loligo forbesii*.

Desse modo, a simplificação do processamento das amostras anterior à amplificação por LAMP abre precedentes para inúmeras aplicações que demandem simplicidade, rapidez e eficácia (CHAOUCH, 2020; FOWLER et al., 2021; MORI; KANDA; NOTOMI, 2013; NOTOMI et al., 2000, 2015; SOROKA; WĄSOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021)

1.5. Considerações sobre as espécies modelo

1.5.1. *Pangasianodon hypophthalmus*

O *Pangasianodon hypophthalmus*, popularmente chamado de panga ou bagre-tubarão-
tra, é um peixe continental, pertencente à família de bagres siluriformes Pangasiidae e é original
do do Delta do Rio Mekong no Vietnã, podendo ser encontrado no sul e sudeste asiático. Eles
são comercializados principalmente na forma de filés congelados e são conservados em
estoques por longos períodos de tempo (HA et al., 2020; SOUZA et al., 2020; WANG; HSIEH,
2016; WAYCOTT, 2015).

Essa espécie tem elevada importância econômica, uma vez que está entre as espécies de
peixes mais consumidas no Brasil e é muito aceita por consumidores em diversos países, por
apresentar sabor suave, coloração branca e ausência de ossos nos filés. Para os produtores, sua
produção apresenta favorável custo-benefício, são peixes de fácil manejo, com alto potencial
de cultivo e muito férteis (HA et al., 2020; SOUZA et al., 2020; WANG; HSIEH, 2016;
WAYCOTT, 2015). Grande parte do panga comercializado no Brasil é importada do Vietnã,
que está no ranking global de exportação desse pescado, devido ao grande cultivo da espécie
no país. Entre os anos de 2008 e 2010, a produção global de peixes panga excedeu a quantia de
um milhão de toneladas e, em 2012, a do Vietnã compôs 75% da produção global (HA et al.,
2020; SOUZA et al., 2020; THO; TUYET; TOJO, 2021). Atualmente é uma mercadoria
exportada para mais de 100 países, tendo como principal mercado a Europa, os Estados Unidos
e a Rússia (WANG; HSIEH, 2016; WAYCOTT, 2015).

No contexto da piscicultura da espécie, semelhante ao de outros grupos de peixes, há
ocorrência de hibridização entre espécies próximas, o que pode comprometer a produção, uma

vez que alguns híbridos são férteis. No caso de *P. hypophthalmus*, a identificação morfológica nos estágios larvais não é muito bem estabelecida e os híbridos adultos não são facilmente distinguidos dos parentais puros, o que pode resultar em uma mistura e contaminação genética dos estoques e plantéis reprodutores (SRIPHAIROJ; NA-NAKORN; KLINBUNGA, 2018).

No comércio de filés de panga, bem como de produtos processados, há a identificação cruzada e substituição fraudulenta de produtos de valor mais alto por mais baratos, como apresentado no tópico 1.3 desta seção. Nesses casos, a identificação com base em morfologia é totalmente inadequada, surgindo, portanto, a necessidade de ferramentas de identificação molecular inovadoras, rápidas e de baixo custo, para a garantia da autenticidade e rastreamento desses produtos, desde a produção, até o consumo (SRIPHAIROJ; NA-NAKORN; KLINBUNGA, 2018; WANG; HSIEH, 2016; WONG et al., 2014). É nesse contexto que a LAMP se mostra, mais uma vez, como uma alternativa promissora para o monitoramento genético da produção e comércio dessa espécie.

1.5.2. *Piaractus mesopotamicus*

A espécie *Piaractus mesopotamicus*, popularmente chamada de Pacu-caranha ou Pacuguaçu, são peixes de água doce caracídeos pertencentes à subfamília Serrasalminae, da família Serrasalmidae. Esses peixes são de grande interesse econômico, e se destacam como maior produção de peixes continentais nativos no Brasil devido à alta qualidade da carne e rendimento produtivo. O seu cultivo é uma alternativa para suprir a demanda comercial e evitar a superexploração dos estoques de populações naturais. No contexto das pisciculturas do Brasil, muitos produtores inter cruzam as espécies, para obterem híbridos, por causa das possíveis vantagens zootécnicas: maior taxa de crescimento, maior resistência a variações ambientais e

doenças (vigor híbrido) e menores taxas de canibalismo (HASHIMOTO, 2011; HASHIMOTO et al., 2011; MARTINS, 2017).

Nesse contexto, a LAMP se apresenta como um método mais efetivo, rápido e de baixo custo de identificação de espécies alternativo à identificação morfológica, que pode ser aplicado pelos produtores de pisciculturas em campo para o monitoramento de suas matrizes genéticas e, assim, prevenir danos e prejuízos às produções e ao meio ambiente (NAGAMINE; HASE; NOTOMI, 2002; NOTOMI et al., 2000, 2015; HASHIMOTO et al., 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Padronizar e otimizar ensaios de amplificação isotérmica mediada por *loop* para amostras de *Pangasianodon hypophthalmus* e *Piaractus mesopotamicus* submetidas a extração de DNA genômico, em comparação com amostras processadas por *Cell lysis solution* e amostras de tecido *in natura*, por meio de marcadores moleculares.

2.2 Objetivos específicos

- Desenhar *primers* LAMP espécie-específicos para a identificação de *Pangasianodon hypophthalmus* e *Piaractus mesopotamicus*;
- Otimizar reações LAMP para aplicar os marcadores em amostras de DNA de *Pangasianodon hypophthalmus* e *Piaractus mesopotamicus* extraídas por kit comercial;

- Comparar a sensibilidade das reações aplicando-as em amostras submetidas a diferentes processamentos por *Cell lysis solution*;
- Comparar a sensibilidade das reações aplicando-as em amostras de tecido *in natura*, não submetidas a nenhum tipo de processamento;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das amostras biológicas

No presente trabalho, foram utilizadas amostras de *Pangasianodon hypophthalmus* e *Piaractus mesopotamicus* para avaliar a especificidade do ensaio de LAMP na identificação de espécies. Foi realizada uma única coleta de exemplares de *P. hypophthalmus* em uma peixaria situada na cidade de Bauru, SP, no dia 27 de outubro de 2021, e foi realizada uma amostragem de dois filés congelados de indivíduos comercializados com a Nomenclatura Comum do Mercosul (NCM) de panga (No 0304.32.90) (FAZCOMEX, 2022). Dez amostras de tecidos de cada filé foram fixadas em álcool absoluto para a posterior análise molecular, totalizando 20 amostras. Após a identificação com códigos internos, todo o material foi incorporado ao banco de tecidos do Laboratório de Genética de Peixes (LaGenPe) da UNESP de Bauru/SP.

Em relação ao *Piaractus mesopotamicus*, foram utilizadas amostras de fragmentos de nadadeira caudal congelados de indivíduos puros do banco de tecidos do LaGenPe previamente coletados e identificados molecularmente por Hashimoto (2011).

3.2 Extração do DNA genômico

A extração e purificação do DNA genômico total de cada indivíduo de *P. hypophthalmus* foi feita a partir de amostras de tecido de músculos coletadas dos filés e dos *P. mesopotamicus*, a partir de fragmentos da nadadeira caudal. Foi utilizado o kit comercial “*Wizard Genomic DNA Purification kit* - Promega (Prodimol Biotecnologia, Belo Horizonte, Minas Gerais Brazil), de acordo com o protocolo padrão do laboratório. 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 incubadas 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 foram centrifugadas 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 temperatura ambiente por 16 horas 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).

3.3 Processamento das amostras de tecido

Além da tradicional extração de DNA, amostras selecionadas de ambas as espécies foram submetidas a diferentes processamentos alternativos para tentativa de extração de DNA

de maneira mais simples e rápida. Foi selecionada a amostra de *P. hypophthalmus* denominada Pg1, em referência ao nome popular da espécie (“panga”), e a amostra PA-15 de *P. mesopotamicus*, também referenciando seu nome comum (“pacu”) e foram utilizados quatro fragmentos de tecido da mesma amostra para cada espécie para os testes. Todos os 8 tubos contendo os fragmentos de tecido foram homogeneizados e acrescido de 1 mL de *Cell lysis solution* do kit comercial da Promega (item 3.2), sendo posteriormente incubados a 60°C em banho-maria em períodos de tempo indicados na Tabela 1.

Tabela 1: Processamento por *Cell lysis solution* das quatro amostras de *P. hypophthalmus* e quatro de *P. mesopotamicus*, submetidas à mesma temperatura (60°C) com tempos de incubação de: 20 horas, 3 horas, 1 hora e 30 minutos.

Identificação da amostra	Espécie	Tempo de incubação	Temperatura de incubação
Pg1 cell lysis 1	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	20 horas	60°C
Pg1 cell lysis 2	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	3 horas	60°C
Pg1 cell lysis 3	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	1 hora	60°C
Pg1 cell lysis 4	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	30 minutos	60°C
PA-15 cell lysis 1	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	20 horas	60°C
PA-15 cell lysis 2	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	3 horas	60°C
PA-15 cell lysis 3	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	1 hora	60°C
PA-15 cell lysis 4	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	30 minutos	60°C

3.4 Amplificação dos genes Citocromo b e RAG2 por PCR convencional

Após a extração de DNA dos indivíduos de ambas as espécies pelo kit da Promega, foram aplicados os respectivos marcadores nucleares na reação de PCR. Para a amplificação dos genes nas 5 amostras de *P. mesopotamicus*, foi aplicado o marcador previamente

desenvolvido e caracterizado por Hashimoto (2011), o gene nuclear ativador da recombinação 2 (RAG2), denominado de RAG2 Serra pelo autor, através do par de *primers forward* (F) e *reverse* (R) espécie-específicos. O volume total foi de 25 µl por amostra, contendo: 100 µl de cada dNTP; 1,5 mM MgCl₂; 1X de Buffer; 1 mM de cada *primer*; 0,5 U de *Taq* e 10-50 ng de DNA. As sequências foram amplificadas 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 30 segundos, temperatura de anelamento de 52° C por 30 segundos, 72°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 7 a 10 minutos (Tabela 4). Por fim, 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.

Para o PCR com amostras de *Pangasianodon hypophthalmus*, os *primers* foram desenhados usando como molde uma sequência do gene mitocondrial Citocromo b da espécie (GenBank MT441543.1), com o auxílio do programa Primer3Plus (disponível em: <https://primer3plus.com/>) e as reações para as 20 amostras da espécie foram realizadas de maneira semelhante às anteriores, no termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), de acordo com a referência de HA et al. (2020), com um volume final de 50µl por amostra, contendo as seguintes concentrações e volumes: 2,5µl de cada dNTP; 2µl de MgCl₂; 10X de Buffer; 0,01 mM de cada *primer*; 1,2 U de *Taq* e 10-50 ng de DNA. O programa utilizado na PCR foi: desnaturação inicial a 94° C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos, com desnaturação a 94°C por 45 segundos, temperatura de anelamento de 54° C por 50 segundos, 72°C por 1 minuto e 20 segundos e extensão a 72°C por 10 minutos (Tabela 2).

Tabela 2: Condições da PCR para *Pangasianodon hypophthalmus* (Citocromo b) e *Piaractus mesopotamicus* (RAG2).

Gene	Desnaturação (95°C)	Ciclos	Extensão (72°C)
------	---------------------	--------	-----------------

Citocromo b	3 minutos	35x 94°C/45s, 54°C/50s, 72°C/80s	10 minutos
RAG2	5 minutos	35x 95°C/30 s, 52°C/30 s, 72°C/30 s	7 minutos

3.5 Otimização do ensaio LAMP para a amplificação dos genes Citocromo b e RAG2

Foi realizada a otimização do ensaio LAMP em ambas as espécies para maior eficiência na amplificação e diagnóstico. Foram utilizadas as amostras submetidas aos tratamentos com solução *Cell lysis*, bem como amostras de DNA extraído pelo kit da Promega de cada espécie e amostras de fragmento de tecido *in natura* sem qualquer tipo de tratamento. Os *primers* específicos de LAMP foram desenhados utilizando NEB LAMP *Primer Design Tool*, versão 1.0.1 (disponível em: www.https://lamp.neb.com/#/).

Inicialmente, o volume total das reações 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 30 minutos e deixada em temperatura ambiente fora do termociclador por cerca de 30 minutos, seguindo o protocolo fornecido pela empresa New England BioLabs ® inc. (NEW ENGLAND BIOLABS, 2022). Foi feita a verificação dos produtos de amplificação por meio da visualização a olho nu em um padrão de cores do rosa ao amarelo, onde a coloração amarelo intenso indica alta concentração de *amplicons* (NEW ENGLAND BIOLABS, 2022).

Em todas as reações para ambas as espécies foi utilizado um controle negativo: um tubo de microcentrífuga contendo apenas 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* de cada espécie e 9 µl de dH₂O, não contendo nenhuma amostra de DNA, conforme recomendado pelo protocolo (NEW ENGLAND BIOLABS, 2022).

Para averiguar a especificidade dos *primers* e das reações para as respectivas espécies, foram realizadas reações cruzadas entre *P. mesopotamicus* e *P. hypophthalmus* e com duas amostras de DNA de outras duas espécies, *Astyanax lacustris* e *Hoplias malabaricus*, incubadas a 65°C, por uma hora, com as mesma concentrações utilizadas para *P. mesopotamicus* e *P. hypophthalmus*. As amostras foram obtidas do banco de tecidos do laboratório.

4 RESULTADOS

Para a identificação molecular das espécies, foram utilizados marcadores com base no gene nuclear RAG2, para *P. mesopotamicus*, e no gene mitocondrial Citocromo b, para *P. hypophthalmus*. A amplificação das amostras de ambas as espécies foi obtida por meio das reações de PCR, com os marcadores selecionados e, em seguida, uma amostragem dos indivíduos foi submetida a análises e testes por meio da LAMP, que são discriminados nos tópicos correspondentes.

4.1 Obtenção dos *primers* espécie-específicos

Tendo em vista que um dos objetivos do presente trabalho foi o desenho de *primers* espécie-específico para *P. hypophthalmus* e *P. mesopotamicus*, a partir de marcadores moleculares amplamente descritos na literatura, Citocromo b (HA et al., 2020) e RAG2 (HASHIMOTO, 2011), respectivamente, foram obtidos os resultados apresentados nos tópicos a seguir.

3.4.1. Obtenção dos *primers* PCR e LAMP para *Pangasianodon hypophthalmus*

Para o desenho dos *primers* de PCR de *Pangasianodon hypophthalmus*, foi utilizado o programa Primer3Plus (disponível em: <https://primer3plus.com/>), com os seguintes critérios observados: serem constituídos de 18 a 22 pares de bases; temperaturas de *melting* (Tm) similares entre os *primers forward* e *reverse* (entre 55 e 60°C); percentual de G/C entre 40 e 60% e apresentando menores taxas de complementaridade ou formação de dímeros. Os *loci* obtidos foram nomeados Cytbph F (*primer forward*) e Cytbph R (*primer reverse*) em referência ao gene selecionado (Cytb) e ao nome da espécie *P. hypophthalmus*, abreviando-se o nome do gênero (p) e da espécie (h) (Tabela 3).

Tabela 3: *Primers* utilizados para amplificação de parte do gene mitocondrial e nuclear de *Pangasianodon hypophthalmus* e *Piaractus mesopotamicus* por PCR.

<i>Primer</i>	Sequência do <i>primer</i>	Referência
Cytbph F Cytbph R	5'- GCCCCATCCAATATTTCCGC - 3' 5'- AAACATATCCGACGAAGGCG - 3'	Presente trabalho
RAG2 Serra F RAG2 Serra R	5'- AGCTGCGTGCCATCTCATTCT - 3' 5'- GTGGCTCTCGAGGTTCCATA -3'	HASHIMOTO, 2011

Para as reações de LAMP com, cinco sequências disponíveis do gene mitocondrial Citocromo b (Cytb) da espécie foram obtidas do GenBank (MT441543.1; KY586036.1; KY586035.1; KY586031.1 e KY586033.1) e alinhadas utilizando o Geneious (versão 7.1.3) para selecionar as regiões conservadas, obtendo sítios de ligação diagnósticos dos *primers* que abrangem essas regiões. Todos os 3 pares de *primers* da espécie foram desenhados (Tabela 4) e identificados como “Cytbph”, seguido da abreviação do respectivo *primer* (Tabela 5).

Tabela 4: Primers utilizados para amplificação de parte do gene mitocondrial e nuclear de *Pangasianodon hypophthalmus*, *Piaractus mesopotamicus* e *Colossoma macropomum* por LAMP.

Espécie/gene	Primer	Sequência do primer
<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (Citocromo b)	F3	5'- CAGGACTTTTCCTAGCCATA - 3'
	B3	5'- GGTTTCTTTATATAAGTAAGAGCCA - 3'
	FIP	5'-CCGTAATTTACATCTCGACAGATGTCATTATACCTCAGACATCTCTACTG-3'
	BIP	5'- ATGAGTCATCCGCAACTTACATGTCCTCGTCCGATGTGTAG - 3'
	LF	5'-GGGCTACGGATGAGAAGG - 3'
	LB	5'- CCAACGGAGCTTCATTCTTT - 3'
	<i>Piaractus mesopotamicus</i> (RAG2)	F3
B3		5'- GCAGGATTTCCCTCCGAC - 3'
FIP		5'- ACTGTGGTGGCTCTCGAGGTTCCGAATGCAGTGCACCTACG - 3'
BIP		5'- CAGTGAGATCAGCCAGAGCCGCAATCAATGCGTCCCCTT - 3'
LF		5'- ACGTATGCCTACATCATCCAG - 3'
LB		-
<i>Colossoma macropomum</i> (RAG2)		F3
	B3	5'- TGGTAGCCACCAAGGATGA - 3'
	FIP	5'- GAGAAGCTCCACACGCAGCCGCCACATTCTCTCCACCG - 3'
	BIP	5'- AGGCAGCCCAGTTCTCTTTGTCCCACAGGAGTTGCAATGG - 3'
	LF	-
	LB	5'- AATGATGGTCTGTCTATTACAAGCG - 3'

Tabela 5: Relação de todas as reações LAMP para as espécies *P. hypophthalmus*, *P. mesopotamicus*, *A. lacustris* e *H. malabaricus*, especificadas as condições de processamento das amostras, tempo e temperatura de incubação da reação, bem como os primers específicos utilizados e a identificação das amostras, além do resultado da detecção de produto de amplificação (Amplificação).

Espécie	Identificação da amostra	Processamento	Primer	Tempo de incubação	Temperatura de incubação	Amplificação
<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	Pg1 extração	Extração	Cytbph	1 hora	65°C	Completa
	Pg2 extração	Extração				Incompleta
	Pg3 extração	Extração				Incompleta
	Pg4 extração	Extração				Incompleta
	Pg8 extração	Extração				Ausente
	Pg10 extração	Extração				Incompleta
	Pg11 extração	Extração				Ausente
	Pg13 extração	Extração				Completa
	Pg14 extração	Extração				Completa
	Pg1 cell lysis 1	Cell lysis 20h				Completa
	Pg1 cell lysis 2	Cell lysis 3h				Completa

	Pg1 <i>cell lysis</i> 3 Pg1 <i>cell lysis</i> 4 Pg1 tecido Pg2 tecido Pg3 tecido Pg4 tecido	<i>Cell lysis</i> 1h <i>Cell lysis</i> 30min Ausente Ausente Ausente Ausente				Completa Completa Completa Completa Completa Completa
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	PA-15 extração PA-16 extração PA-17 extração PA-18 extração PA-19 extração PA-16 tecido PA-17 tecido PA-18 tecido PA-19 tecido PA-15 extração PA-16 extração PA-17 extração PA-18 extração PA-19 extração PA-15 <i>cell lysis</i> 1 PA-15 <i>cell lysis</i> 2 PA-15 <i>cell lysis</i> 3 PA-15 <i>cell lysis</i> 4 PA-16 tecido PA-17 tecido PA-18 tecido PA-19 tecido	Extração Extração Extração Extração Extração Ausente Ausente Ausente Ausente Extração Extração Extração Extração Extração <i>Cell lysis</i> 20h <i>Cell lysis</i> 3h <i>Cell lysis</i> 1h <i>Cell lysis</i> 30min Ausente Ausente Ausente Ausente	Cytbph Cytbph Cytbph Cytbph Cytbph Cytbph Cytbph Cytbph Cytbph RAG2pm RAG2pm RAG2pm RAG2pm RAG2pm RAG2pm RAG2pm RAG2pm RAG2pm RAG2pm RAG2pm RAG2pm	2 horas	65°C	Incompleta Incompleta Incompleta Incompleta Incompleta Ausente Incompleta Ausente Ausente Completa Incompleta Incompleta Incompleta Incompleta Incompleta Incompleta Ausente Incompleta Incompleta Completa Incompleta
<i>Astyanax lacustris</i>	<i>A. lacu</i> II Cytbph <i>A. lacu</i> II RAG2pm	Extração Extração	Cytbph RAG2pm	1 hora	65°C	Completa Incompleta
<i>Hoplias malabaricus</i>	<i>H. mala</i> II A Cytbph <i>H. mala</i> II A RAG2pm	Extração Extração	Cytbph RAG2pm	1 hora	65°C	Completa Incompleta

3.4.1. Obtenção dos primers LAMP para *Piaractus mesopotamicus*

Os *primers* utilizados no ensaio LAMP com *P. mesopotamicus* foram desenhados da seguinte maneira: seis sequências disponíveis do gene nuclear RAG2 das espécies *Piaractus mesopotamicus* (AY804118.1; HQ420867.1; HQ420866.1; HQ420865.1; HQ420864.1 e HQ420863.1) e *Colossoma macropomum* (AY804061.1; HQ420877.1; HQ420876.1; HQ420875.1; HQ420874.1 e HQ420873.1) foram obtidas do GenBank e alinhadas utilizando

o *software* de bioinformática Geneious (versão 7.1.3) para selecionar as regiões conservadas dentro de cada espécie. Foi escolhida a espécie *C. macropomum* para a comparação das sequências, devido à sua proximidade filogenética e semelhança dos genes entre as espécies. Posteriormente, foi feito um novo alinhamento entre as sequências do RAG2 das duas espécies para que fossem selecionadas as regiões diagnósticas, com maior quantidade de polimorfismos e disparidades entre elas (Figura 10 e Figura 11). Ao final, os *primers* de *P. mesopotamicus*, com exceção do LB, foram desenhados utilizando NEB LAMP *Primer Design Tool* (versão 1.0.1), baseado nas regiões de anelamento de *primers* do gene que apresentaram maiores diferenças entre as espécies (Tabela 4) e foram identificados como RAG2pm e a sigla do respectivo *primer* (Tabela 5).

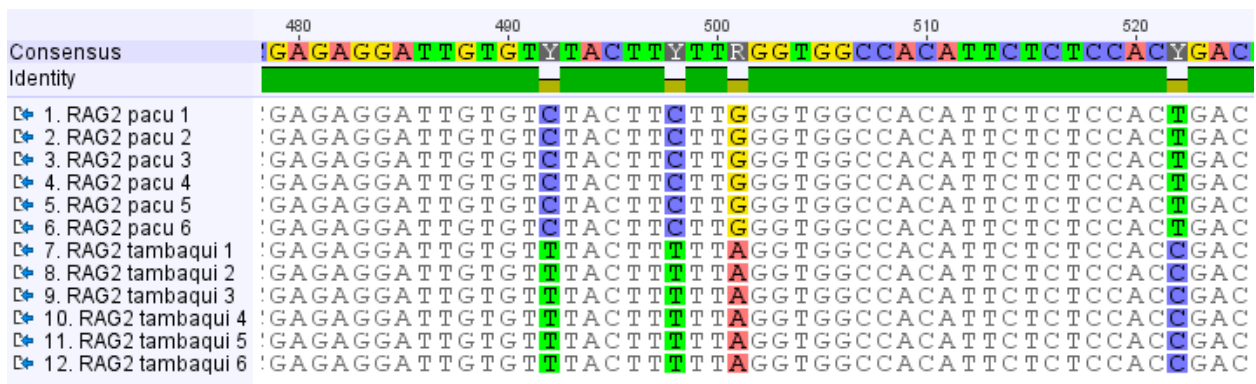


Figura 10: Alinhamento das regiões conservadas de seis sequências do gene RAG2 de *P. mesopotamicus* (pacu) e *C. macropomum* (tambaqui). Seção de 479 bp to 524 visível.

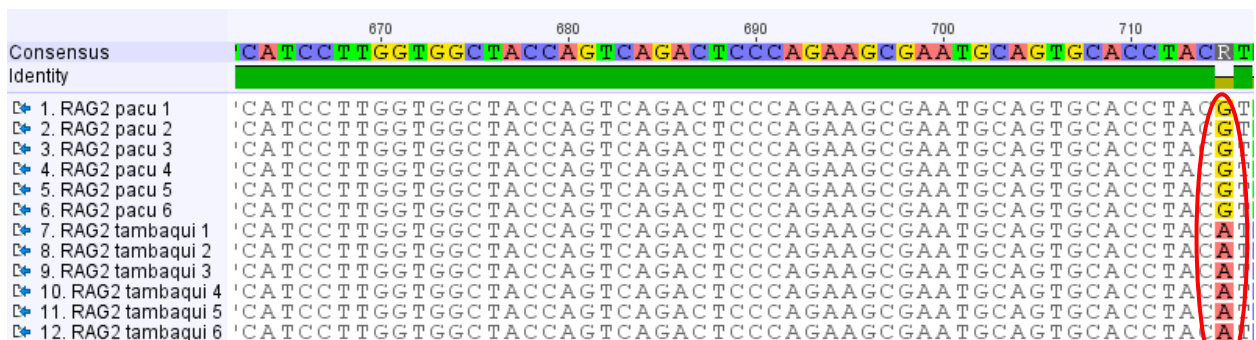


Figura 11: Alinhamento das regiões conservadas de seis sequências do gene RAG2 de *P. mesopotamicus* (pacu) e *C. macropomum* (tambaqui). Seção de 665 pb a 716 pb visível. Região polimórfica destacada em vermelho.

Para averiguar a especificidade dos *primers* desenhados, foi feito um último alinhamento entre as sequências dos genes e as sequências dos *primers* FIP de *P. mesopotamicus* e *C. macropomum*, para averiguar o anelamento na região diagnóstica com um polimorfismo entre as espécies em sua extremidade 5' (Figura 12). Foram selecionados os *primers* internos para o alinhamento, uma vez que suas características são as responsáveis pela maior especificidade do ensaio LAMP (NOTOMI et al., 2015; XIONG et al.2020).

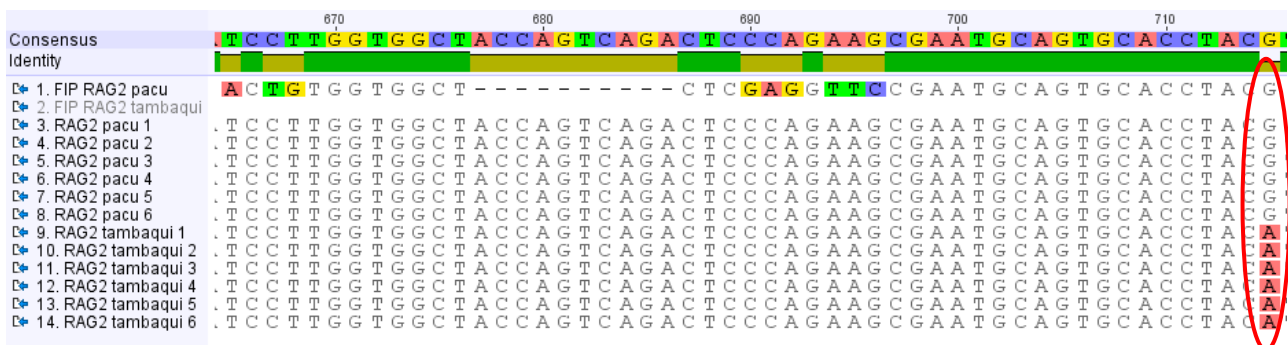


Figura 12: Alinhamento entre as 12 sequências do gene RAG2 de *P. mesopotamicus* (pacu) e *C. macropomum* (tambaqui) e os *primers* FIP das duas espécies. Seção de 665 pb a 716 pb visível. Evidenciando a região de anelamento do *primer* FIP de *P. mesopotamicus* em vermelho.

Anteriormente à escolha do RAG2 como marcador molecular para a espécie, foram feitos testes e tentativas de *design* de *primers* utilizando outros genes nucleares, como TROP; GLOB; EF1 α e 18S (HASHIMOTO, 2011). No entanto, nenhum deles se mostrou espécie-específico, com exceção do RAG2.

4.2 Análise por LAMP para a identificação de amostras

Ao visualizar os produtos, a cor amarelo-clara indica moderada concentração de *amplicons*, alaranjada, amplificação incompleta e baixa concentração de *amplicons* e, por último, a permanência da coloração rosa indica ausência de amplificação. Para as análises do presente trabalho foram considerados como resultados positivos para amplificação completa as

colorações amarelo intenso e amarelo claro; como resultados intermediários de amplificação incompleta, a coloração alaranjada e para resultados negativos pela ausência de produtos de amplificação, a coloração rosa (NEW ENGLAND BIOLABS, 2022).

Para ambas as espécies, com um tempo de reação de apenas 30 minutos foi obtida apenas a coloração laranja nos tubos, indicando amplificação incompleta, portanto, eles foram incubados novamente por mais 30 minutos. Para *P. mesopotamicus*, uma hora de incubação ainda não foi suficiente, portanto, após 30 minutos em temperatura ambiente, foi estendida por mais 1 hora, totalizando 2 horas de incubação (Tabela 5) (NEW ENGLAND BIOLABS, 2022).

4.2.1. Amostras de *Pangasianodon hypophthalmus*

Dentre os resultados das reações LAMP de *P. hypophthalmus* utilizando seu *primer* específico, observou-se amplificação completa em 11 das 17 amostras, destacados pela coloração amarela dos tubos, que indica resultado positivo pela presença de *amplicons*. Surpreendentemente, as amostras de tecido *in natura* e as processadas por *cell lysis solution* apresentaram os melhores resultados visuais, com coloração amarela intensa, indicando amplificação completa pela alta concentração de *amplicons* nos tubos, sendo que nenhuma apresentou ausência de *amplicons*, pela permanência da coloração rosa (Tabela 5, Figura 13; 14).

Em contrapartida, dentre as amostras submetidas à extração convencional de DNA genômico, 4 das 9 apresentaram um resultado intermediário (coloração alaranjada), indicando amplificação incompleta ou pouca concentração de produtos; duas apresentaram ausência de amplificação, resultado negativo e apenas três apresentaram amplificação completa, resultado positivo (Tabela 5, Figura 15; 16).

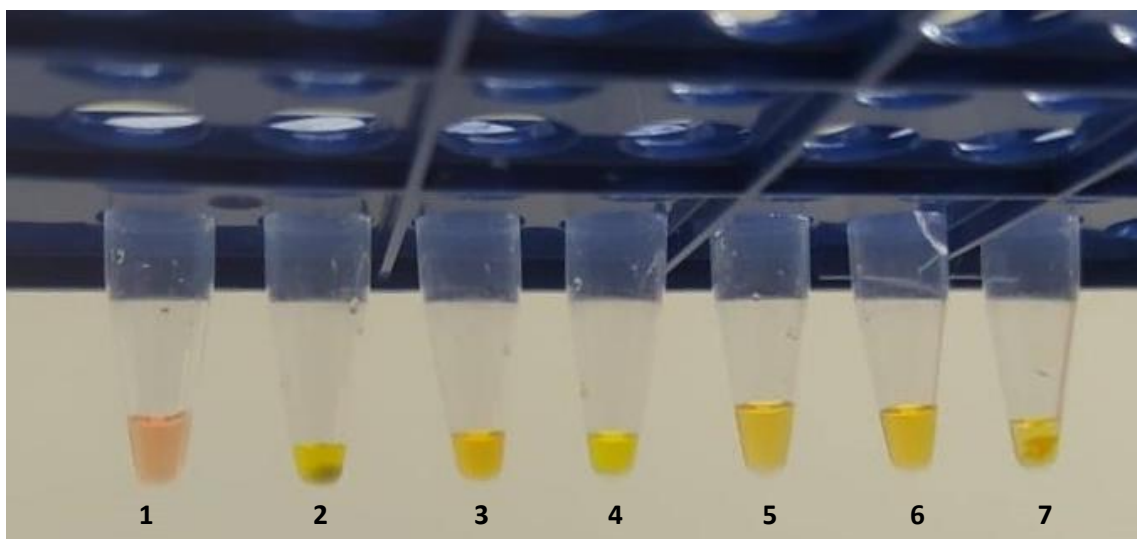


Figura 13: Visualização a olho nu dos resultados de mudança de coloração das amostras de *P. hypophthalmus*, submetidas à reação LAMP com *primers* desenhados para *P. hypophthalmus*. a esquerda para a direita, (1) controle negativo, manutenção da coloração rosa, indicando ausência de amplificação. (2) Amostra “Pg1 extração”, anteriormente submetida à extração convencional de DNA, apresentando mudança da coloração rosa para amarela, indicando presença de *amplicons*. (3) Amostra “Pg1 cell lysis 1”, anteriormente processada por *cell lysis solution* durante 20 horas, indicando presença de *amplicons*. (4) Amostra “Pg1 cell lysis 2”, anteriormente processada por *cell lysis solution* durante 3 horas, indicando presença de *amplicons*. (5) “Amostra Pg1 cell lysis 3”, anteriormente processada por *cell lysis solution* durante 1 hora, indicando presença de *amplicons*. (6) Amostra “Pg1 cell lysis 4”, anteriormente processada por *cell lysis solution* durante 30 minutos, indicando presença de *amplicons*. (7) Amostra “Pg1 tecido”, fragmento de tecido sem nenhum tratamento, indicando presença de *amplicons*.

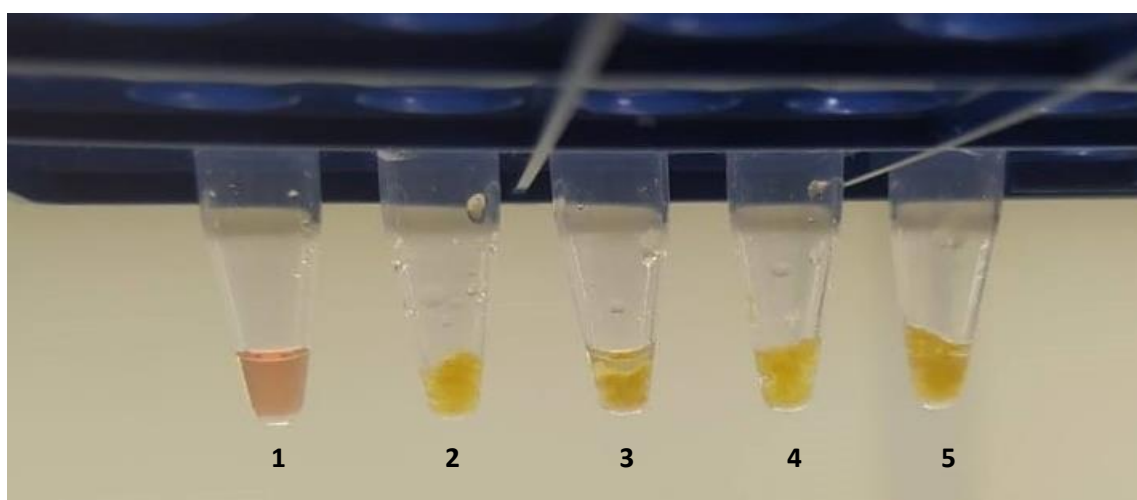


Figura 14: Visualização a olho nu dos resultados de mudança de coloração das amostras de *P. hypophthalmus*, submetidas à reação LAMP com *primers* desenhados para *P. hypophthalmus*. Da esquerda para a direita, (1) controle negativo, manutenção da coloração rosa, indicando ausência de amplificação. (2) Amostra “Pg1 tecido”, fragmento de tecido sem nenhum tratamento, apresentando mudança da coloração rosa para amarela, indicando presença de *amplicons*. (3) Amostra “Pg2 tecido”, indicando presença de *amplicons*. (4) Amostra “Pg3 tecido”, indicando presença de *amplicons*. (5) Amostra “Pg4 tecido”, indicando presença de *amplicons*.

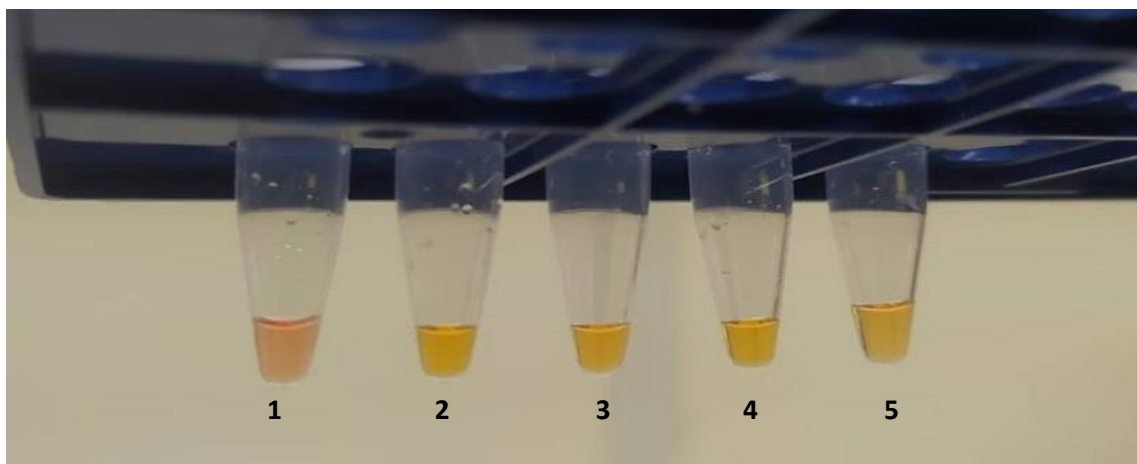


Figura 15: Visualização a olho nu dos resultados de mudança de coloração das amostras de *P. hypophthalmus*, submetidas à reação LAMP com *primers* desenhados para *P. hypophthalmus*. Da esquerda para a direita, (1) controle negativo, manutenção da coloração rosa, indicando ausência de amplificação. (2) Amostra “Pg1 extração”, anteriormente submetida à extração convencional de DNA, apresentando mudança da coloração rosa para amarela, indicando presença de *amplicons*. (3) Amostra “Pg2 extração”, indicando presença de *amplicons*. (4) Amostra “Pg3 extração”, indicando presença de *amplicons*. (5) Amostra “Pg4 extração”, indicando presença de *amplicons*.

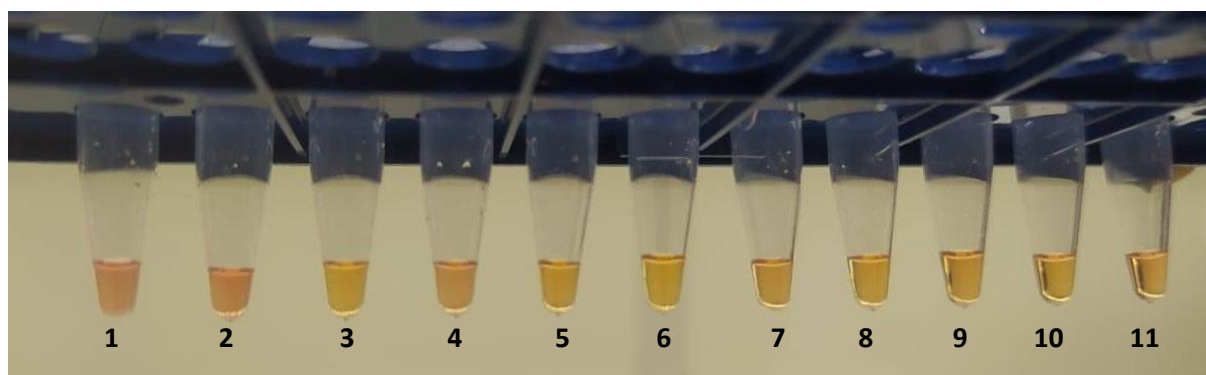


Figura 16: Visualização a olho nu dos resultados de mudança de coloração das amostras de *P. hypophthalmus* e *P. mesopotamicus*, submetidas à reação LAMP com *primers* desenhados para *P. hypophthalmus*. Da esquerda para a direita, (1) controle negativo, manutenção da coloração rosa, indicando ausência de amplificação. (2) Amostra “Pg8 extração”, anteriormente submetida à extração convencional de DNA, apresentando modesta mudança da coloração rosa para amarela, indicando presença de pequena concentração de *amplicons*. (3) Amostra “Pg10 extração”, indicando presença de *amplicons*. (4) Amostra “Pg11 extração”, apresentando modesta mudança da coloração rosa para amarela, indicando presença de pequena concentração de *amplicons*. (5) “Pg13 extração”, indicando presença de *amplicons*. (6) Amostra “Pg14 extração”, indicando presença de *amplicons*. (7) Amostra “PA-15 extração”, indicando presença de *amplicons*; (8) Amostra “PA-16 extração”, indicando presença de *amplicons*; (9) Amostra “PA-17 extração”, indicando presença de *amplicons*; (10) Amostra “PA-18 extração”, indicando presença de *amplicons*; (11) Amostra “PA-19 extração”, indicando presença de *amplicons*.

Na reação cruzada de amostras de indivíduos de *A. lacustris* e *H. malabaricus* amplificadas pelo *primer* especificamente desenhado para *P. hypophthalmus*, os resultados

também foram inesperados, pois ambas apresentaram coloração amarela, indicando amplificação completa (Tabela 5, Figura 17). Na amplificação cruzada com amostras de DNA extraído de indivíduos de *P. mesopotamicus*, todas apresentaram amplificação incompleta (Tabela 5, Figura 17 e 18). Em contrapartida, as amostras de tecido *in natura* demonstraram ausência de amplificação, com exceção de uma que apresentou coloração alaranjada (Tabela 4, Figura 18).

Todos tubos de controle negativo para os *primers* de *P. hypophthalmus* da reação na ausência de *template* de DNA permaneceram com a coloração rosa, expressando ausência de *amplicons* e demonstrando, assim, não ter havido auto-amplificação por interação entre os *primers*.

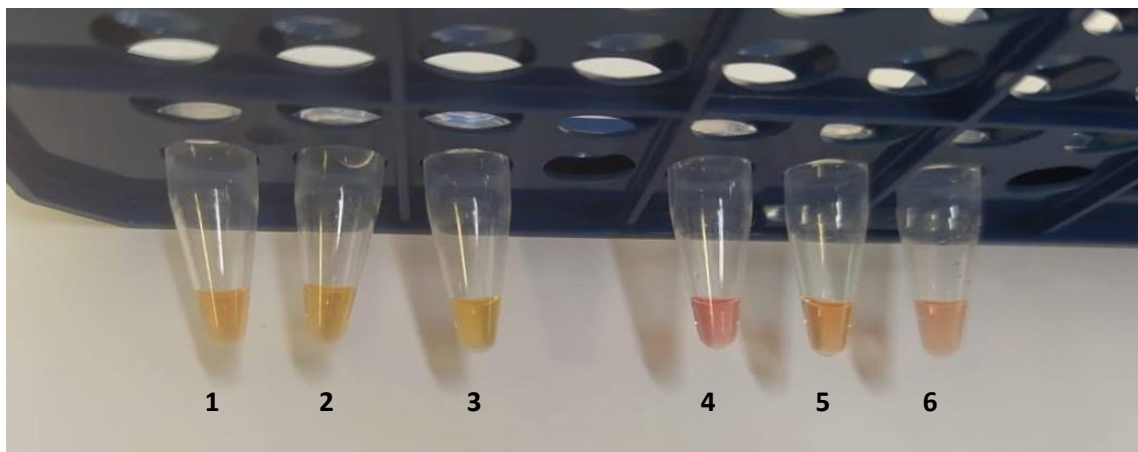


Figura 17: Visualização a olho nu dos resultados de mudança de coloração das amostras de *P. hypophthalmus*, *A. lacustris*, *H. malabaricus* e *P. mesopotamicus*, submetidas à reação LAMP com *primers* desenhados para *P. hypophthalmus* (três tubos da esquerda) e para *P. mesopotamicus* (três tubos da direita). Da esquerda para a direita, (1) Amostra “Pg1 extração”, amplificada pelo *primer* desenhados para *P. hypophthalmus* (Cytbph), apresentando mudança de coloração rosa para a amarela, indicando presença de *amplicons*. (2) Amostra “*A. lacu* II Cytbph”, amplificada pelo *primer* Cytbph, indicando presença de *amplicons*. (3) Amostra “*H. mala* II A Cytbph”, indicando presença de *amplicons*. (4) Amostra “PA-15 extração”, amplificada pelo *primer* desenhados para *P. mesopotamicus* (RAG2pm), não apresentando mudança de coloração rosa para a amarela, indicando ausência de *amplicons*. (5) Amostra “*A. lacu* II RAG2pm”, amplificada pelo *primer* RAG2pm, apresentando leve mudança de coloração rosa para a alaranjada, indicando baixa concentração de *amplicons*. (6) Amostra “*H. mala* II A RAG2pm”, indicando baixa concentração de *amplicons*.

4.3.1. Amostras de *Piaractus mesopotamicus*

As reações LAMP com amostras de *P. mesopotamicus* utilizando seu *primer* específico apresentaram resultados inesperados, pela predominância da coloração alaranjada, amplificação incompleta. Todas as amostras de DNA extraído apresentaram coloração alaranjada, com exceção de uma amostra que obteve amplificação completa (Tabela 5, Figura 21); as processadas por *Cell lysis solution* também, com exceção de uma que permaneceu com a coloração rosa (Tabela 5, Figura 20) e, das quatro amostras de tecido *in natura*, três indicaram amplificação incompleta e uma completa (Tabela 5, Figura 19).

Há uma discrepância entre os resultados apresentados na Tabela 5, com os demonstrados nas figuras, pois foi observado que, após o fim das reações e armazenamento a temperatura ambiente, no intervalo de dias, alguns tubos de coloração alaranjada mudaram para amarelo.

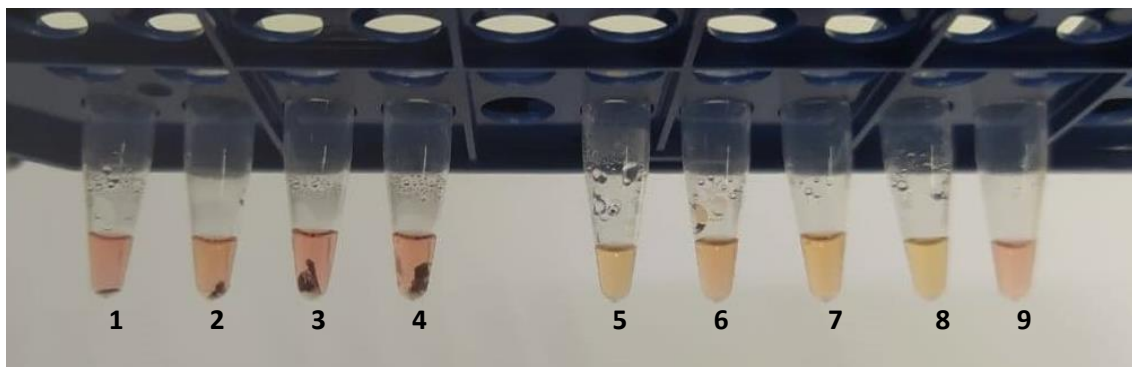


Figura 18: Visualização a olho nu dos resultados de mudança de coloração das amostras de *P. mesopotamicus*, submetidas à reação LAMP com *primers* desenhados para *P. hypophthalmus*. Da esquerda para a direita, (1) Amostra “PA-16 tecido”, fragmento de tecido sem nenhum tratamento, não apresentando mudança da coloração rosa para amarela, indicando ausência de *amplicons*. (2) Amostra “PA-17 tecido”, apresentando sutil mudança da coloração rosa para amarela indicando baixa concentração de *amplicons*. (3) Amostra “PA-18 tecido”, indicando ausência de *amplicons*. (4) Amostra “PA-19 tecido”, indicando ausência de *amplicons*. (5) Amostra “PA-16 extração”, apresentando sutil mudança de coloração do rosa para o alaranjado, indicando pequena concentração de *amplicons*. (6) Amostra “PA-17 extração”, indicando pequena concentração de *amplicons*. (7) Amostra “PA-18 extração”, indicando pequena concentração de *amplicons*. (8) Amostra “PA-19 extração”, indicando pequena concentração de *amplicons*. (9) Controle negativo, manutenção da coloração rosa, indicando ausência de amplificação.

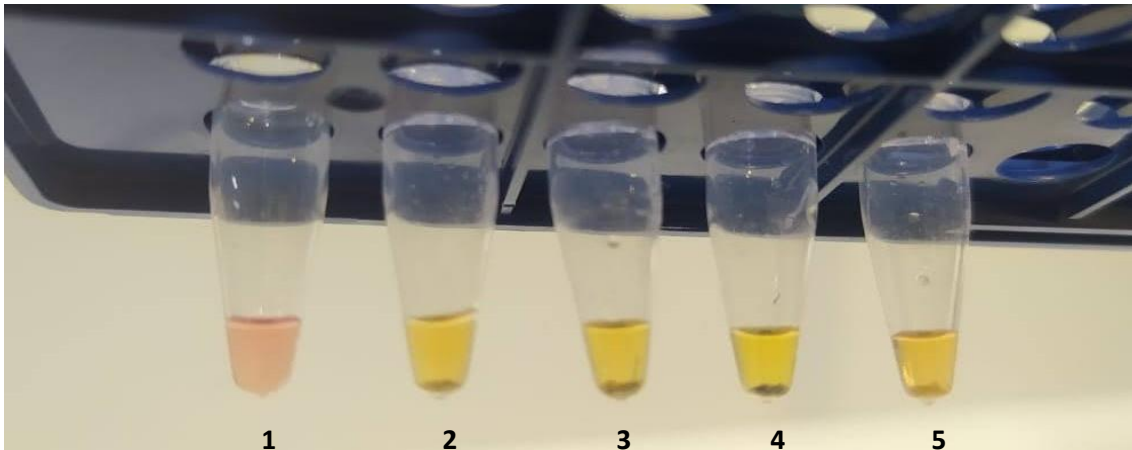


Figura 19: Visualização a olho nu dos resultados de mudança de coloração das amostras de *P. mesopotamicus*, submetidas à reação LAMP com *primers* desenhados para *P. mesopotamicus*. Da esquerda para a direita, (1) controle negativo, manutenção da coloração rosa, indicando ausência de amplificação. (2) Amostra “PA-16 tecido”, fragmento de tecido sem nenhum tratamento, apresentando mudança da coloração rosa para amarela, indicando presença de *amplicons*. (3) Amostra “PA-17 tecido”, indicando presença de *amplicons*. (4) Amostra “PA-18 tecido”, indicando presença de *amplicons*. (5) Amostra “PA-19 tecido”, indicando presença de *amplicons*.

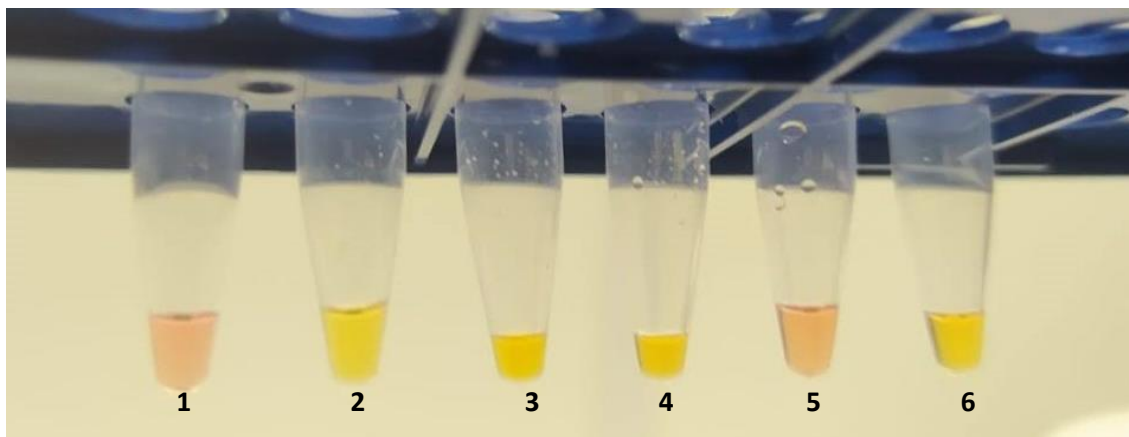


Figura 20: Visualização a olho nu dos resultados de mudança de coloração das amostras de *P. mesopotamicus*, submetidas à reação LAMP com *primers* desenhados para *P. mesopotamicus*. Da esquerda para a direita, (1) controle negativo, manutenção da coloração rosa, indicando ausência de amplificação. (2) Amostra “PA-15 extração”, anteriormente submetida à extração convencional de DNA, apresentando mudança da coloração rosa para amarela, indicando presença de *amplicons*. (3) Amostra “PA-15 cell lysis 1”, anteriormente processada por *cell lysis solution* durante 20 horas, indicando presença de *amplicons*. (4) Amostra “PA-15 cell lysis 2”, anteriormente processada por *cell lysis solution* durante 3 horas, indicando presença de *amplicons*. (5) Amostra “PA-15 cell lysis 3”, anteriormente processada por *cell lysis solution* durante 1 hora, apresentando sutil mudança de coloração do rosa para o alaranjado, indicando pequena concentração de *amplicons*. (6) Amostra “PA-15 cell lysis 4”, anteriormente processada por *cell lysis solution* durante 30 minutos, indicando presença de *amplicons*.

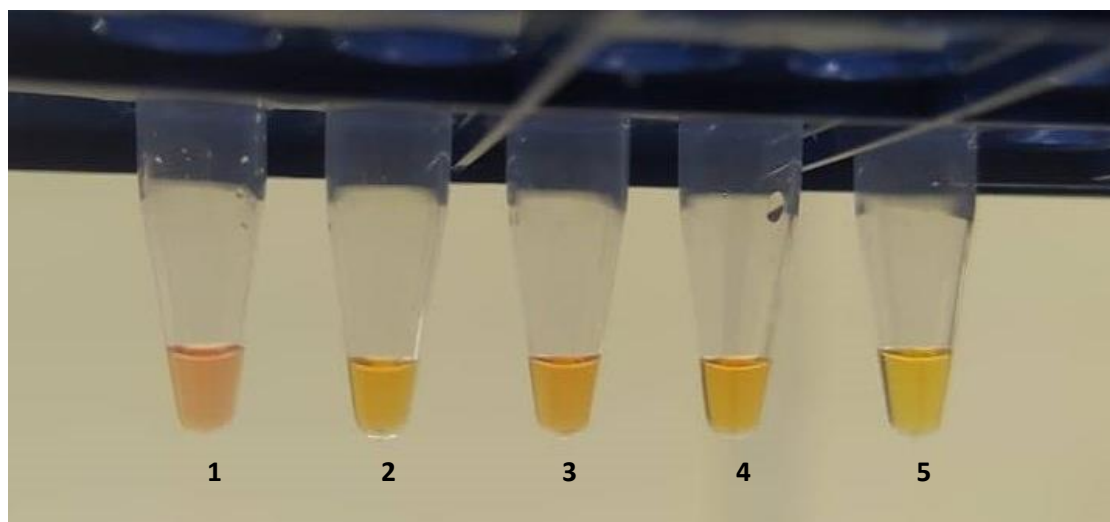


Figura 21: Visualização a olho nu dos resultados de mudança de coloração das amostras de *P. mesopotamicus*, submetidas à reação LAMP com *primers* desenhados para *P. mesopotamicus*. Da esquerda para a direita, (1) controle negativo, manutenção da coloração rosa, indicando ausência de amplificação. (2) Amostra “PA-16 extração”, anteriormente submetida à extração convencional de DNA, apresentando mudança da coloração rosa para amarela, indicando presença de *amplicons*. (3) Amostra “PA-17 extração”, indicando presença de *amplicons*. (4) Amostra “PA-18 extração”, indicando presença de *amplicons*. (5) Amostra “PA-19 extração”, indicando presença de *amplicons*.

Na amplificação cruzada de amostras de *A. lacustris* e *H. malabaricus* com os *primers* específicos de *P. mesopotamicus*, os resultados foram mais próximos do esperado, uma vez que ambas as reações apresentaram coloração alaranjada (Tabela 5, Figura 17). Além disso, assim como para os *primers* de *P. hypophthalmus*, os tubos de controle negativo para os de *P. mesopotamicus* permaneceram com a coloração rosa demonstrando não ter havido interação entre os *primers* e auto-amplificação.

5 DISCUSSÃO

A técnica de Amplificação Isotérmica Mediada por *Loop* é um método bastante prático quando equiparado a outras metodologias de diagnóstico molecular, pois ela pode ser realizada de maneira simples, em contextos de ausência de equipamentos sofisticados e pessoas com treinamento especializado. Muitos estudos descrevem a utilização da técnica para identificação

de patógenos para o diagnóstico de doenças infecciosas em plantas, animais e seres humanos; para a identificação de espécies de seres vivos, com enfoque em conservação ou fiscalização de produtos comercializados e dando destaque para aplicações em campo e *point-of-care testing*.

Mais recentemente, a LAMP vem sendo utilizada em ensaios de detecção do vírus SARS-Cov 2 em infecções de COVID-19, motivo esse que trouxe uma maior atenção para a técnica e incentivou mais estudos para sua descrição, padronização e otimização (CHAOUCH, 2020; KUNDAPUR; NEMA, 2016; NAGAMINE; HASE; NOTOMI, 2002; NOTOMI et al., 2015; SOROKA; WĄSOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021; XIONG et al., 2021b). A partir disso, foi aplicada a técnica para a identificação de espécies de peixes dentro da problemática da piscicultura de híbridos de *Piaractus mesopotamicus*, bem como da autenticação de produtos processados de *Pangasianodon hypophthalmus*.

5.1 Marcadores de LAMP e PCR convencional na identificação de *Pangasianodon hypophthalmus*

Como mencionado anteriormente, o contexto de comercialização de produtos processados de *P. hypophthalmus* se insere na problemática de fraudes, rotulagem errada e substituição de espécies. Para a autenticação desses produtos, a identificação morfológica é totalmente inadequada, já que eles são descaracterizados e tratados com produtos químicos e processos físicos que alteram suas características fenotípicas distintivas, além de a carne do pangá ser muito semelhante à de diversas outras espécies comumente comercializadas, como a merluza, a tilápia e a pescada (ČLANJAK–KUDRA et al., 2021; HA et al., 2020; SOUZA et

al., 2020; SRIPHAIROJ; NA-NAKORN; KLINBUNGA, 2018; WANG; HSIEH, 2016; WONG et al., 2014; WAYCOTT, 2015).

Nesse cenário é urgente um método de determinação de espécies que seja simples, de baixo custo e com capacidade de identificação específica de amostras submetidas a diferentes condições físicas e químicas, como cruas, cozidas, defumadas e congeladas, para a garantia dos direitos e proteção da saúde e bem estar dos consumidores (ČLANJAK–KUDRA et al., 2021; XIONG et al., 2021a). O DNA *barcoding* é o método mais comumente utilizado, no entanto, a LAMP compreende os critérios e é mais vantajosa (ČLANJAK–KUDRA et al., 2021, XIONG et al., 2020, YU et al., 2019), sendo proposta no presente trabalho como uma técnica viável de identificação de *P. hypophthalmus* em filés de peixes congelados.

Para o desenvolvimento e otimização das reações LAMP e PCR específica para *P. hypophthalmus* foi escolhido como marcador molecular o gene mitocondrial Citocromo b, que atendia aos critérios propostos por Notomi et al. (2000) de que os melhores resultados foram obtidos com sequências de DNA de 130 a 200 pares de bases. Além disso, as variações de sequências desse gene já foram amplamente utilizadas e padronizadas como marcadores moleculares excelentes para a caracterização de diferentes recursos genéticos, assim como para estudos de variação genética, relações filogenéticas e taxonomia de espécies de peixes (ČLANJAK–KUDRA et al., 2021; HA et al., 2020; XIONG et al., 2020). O DNA mitocondrial é especialmente vantajoso, por possuir múltiplas cópias, alta taxa evolutiva e herança materna (XIONG et al., 2020).

Após a escolha do marcador molecular, o principal desafio para uma reação altamente eficiente de LAMP é o *design* do conjunto de *primers* espécie-específicos, que devem se adequar a critérios rigorosos como concentração; porcentagem de G/C; localização dos pares de nucleotídeos; distância entre regiões do DNA e os *primers* não devem criar uma estrutura de fita dupla a 60 - 65°C (XIONG et al., 2020). Outro ponto importante é que deve ser feita uma

escolha de regiões de anelamento de *primers* na extremidade 3' de F3; F2; B2 e B3 e na 5' de F1c e B1c que garantam suficientes incompatibilidades entre a espécie alvo e as não-alvo (NAGAMINE; HASE; NOTOMI, 2002; NOTOMI et al. 2000, 2015; XIONG et al., 2020; YU et al., 2019).

A escolha da região de anelamento desses *primers* foi especialmente desafiadora, uma vez que não foram realizados alinhamentos entre as sequências de Citocromo b da espécie com outras semelhantes e filogeneticamente próximas anteriores ao *design* pelo *software*. A sequência foi depositada no *software* e a região flanqueadora foi determinada de acordo com seus critérios *default*. Em seu ensaio LAMP para a identificação de *Salmo salar* em produtos processados derivados de peixes, Xiong et al. (2021b) fez um alinhamento entre as sequências do gene Citocromo b da espécie-alvo com as de outras espécies relacionadas. Seus resultados indicaram que não houve reação-cruzada com outras espécies não-alvo e que, portanto, os *primers* obtidos são espécie-específicos para o alvo, diferentemente do que foi obtido no presente trabalho para *P. hypophthalmus*.

Isso comprometeu a especificidade da reação e no momento de visualização dos resultados, foi observada amplificação não específica nas espécies não-alvo, *Piaractus mesopotamicus*, *Astyanax lacustris* e *Hoplias malabaricus*. Diante disso, pode-se concluir que o conjunto de primers LAMP provavelmente foi desenhado em uma região muito conservada entre as espécies e inespecífica para *P. hypophthalmus*. Esses resultados também são contrários aos de Xiong et al. (2021a), que fizeram os alinhamentos entre *Katsuwonus pelamis* (espécie - alvo) e várias outras próximas que poderiam resultar em falsos positivos, obtendo regiões de anelamento de *primers* em regiões com diferenças suficientes entre as sequências.

Apesar da inespecificidade da reação, os resultados apresentaram congruência com outros trabalhos ao demonstrar sua habilidade de amplificar sequências de DNA presentes na mistura da reação submetidas a diferentes processamentos, uma vez que houve um espectro de

mudança notável de coloração nos tubos (NAGAMINE; HASE; NOTOMI, 2002; NOTOMI et al. 2000, 2015; XIONG et al., 2020; XIONG et al., 2021a; XIONG et al., 2021b; YU et al., 2019).

5.2 Marcadores de LAMP e PCR convencional na identificação de *Piaractus mesopotamicus*

Na piscicultura brasileira de peixes continentais, com ênfase em *Piaractus mesopotamicus*, o principal problema se encontra na identificação de indivíduos puros e híbridos no manejo e monitoramento dos estoques dos reprodutores e matrizes (HASHIMOTO et al., 2011, 2016; PORTO-FORESTI et al., 2013; PRADO et al., 2017). O uso de marcadores morfológicos para a identificação é falho e prejudicial para a piscicultura, pois pode conduzir a uma subestimativa da frequência dos híbridos, que tem potencial de comprometer a integridade genética do plantel e diminuir o lucro e/ou a produção. Os híbridos interespecíficos desses peixes, quando não identificados e mal manejados, podem apresentar prejuízos aos produtores e sérios danos ao meio ambiente, pois muitos indivíduos de cativeiro escapam e podem contaminar as populações naturais, levando a uma introgressão genética, sendo, portanto, uma ameaça para a biodiversidade (ALLENDORF et al., 2010; HASHIMOTO et al., 2011, 2016; PORTO-FORESTI et al., 2013; PRADO et al., 2017).

Diante disso, os marcadores moleculares de DNA permitem o conhecimento do perfil genético dos indivíduos e são muito mais eficientes no monitoramento de híbridos de peixes; podendo minimizar e, até, eliminar esses problemas (HASHIMOTO et al., 2011, 2016; PORTO-FORESTI et al., 2013; PORTO-FORESTI et al., 2013; PRADO et al., 2017). O monitoramento genético de híbridos de *P. mesopotamicus* por análises de PCR é amplamente

descrito na literatura, no entanto, trabalhos que utilizam a LAMP para esse propósito são inexistentes. Diante disso, no presente trabalho, pela primeira vez foi proposto o uso da LAMP como método mais efetivo, rápido e de baixo custo, que no futuro pode ser aplicado pelos produtores de pisciculturas em campo para o monitoramento de suas matrizes genéticas (NAGAMINE et al. 2002; NOTOMI et al., 2000, 2015) e, assim, prevenir danos e prejuízos às produções e ao meio ambiente (HASHIMOTO et al., 2011)

Para a aplicação na LAMP de *P. mesopotamicus*, o marcador molecular baseado no gene nuclear RAG2 descrito por Hashimoto (2011) foi selecionado de acordo com os mesmos critérios técnicos que os de *P. hypophthalmus*, sendo ele confirmadamente específico para a identificação de indivíduos puros e híbridos de peixes serrasalmídeos (HASHIMOTO, 2011; HASHIMOTO et al., 2011, 2016). O erro no *design* do conjunto de *primers* de *P. hypophthalmus* foi corrigido para os de *P. mesopotamicus*, a partir do alinhamento feito entre as sequências do gene da espécie com as de outra não-alvo, *Colossoma macropomum*. Os alinhamentos foram extremamente úteis ao fornecer a região específica para o anelamento dos *primers* da espécie que não resultasse em reação cruzada com outras não-alvo e que abrangesse os polimorfismos interespecíficos, de maneira condizente com o recomendado nos trabalhos de Nagamine, Hase e Notomi (2002); Notomi et al. (2000 e 2015); Tatulli et al. (2020); Xiong et al. (2020) e Yu et al. (2019).

No entanto, para a espécie, não foi desenhado o *primer loop backwards* (LB) complementar ao LF devido a uma falha de identificação da sequência pelo software NEB LAMP *Primer Design Tool*. Isso foi crítico para os resultados da amplificação, uma vez que todas as amostras, com exceção de duas, apresentaram amplificação incompleta (coloração alaranjada), muito provavelmente devido à ausência desse *primer*, que afeta a eficácia da reação. Esse também foi o motivo pelo qual as amostras de *P. mesopotamicus* necessitaram de um tempo maior de incubação (2 horas) que as de *P. hypophthalmus* (1 hora), já que a

incorporação dos *primers loop* ao protocolo aumenta a velocidade e seletividade da reação (NAGAMINE; HASE; NOTOMI 2002, SOROKA; WAŚOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021). No entanto, os tubos mudaram de coloração do rosa para o alaranjado, indicado haver tido reação, porque a sua especificidade está relacionada aos *primers* internos (NOTOMI et al., 2015).

De maneira análoga ao desempenhado para *P. hypophthalmus*, a especificidade da LAMP para *P. mesopotamicus* foi averiguada a partir da reação cruzada com amostras de *P. hypophthalmus*, *Astyanax lacustris* e *Hoplias malabaricus*. Nos resultados para o pacu, nesse caso, foi observada ausência de reação completa cruzada nas amostras das três espécies, pois os tubos permaneceram na coloração rosa. Esses dados podem indicar a possibilidade de essa reação ser espécie-específica para a identificação de *P. mesopotamicus*. Resultados semelhantes foram obtidos por Yu et al. (2019), que realizaram amplificação cruzada entre as duas espécies-alvo, felis e vulpes, e mais oito espécies morfológicamente semelhantes comumente trocadas no comércio de peles, não obtendo reatividade, demonstrando alta seletividade da reação.

Como os primers de PCR utilizados para a espécie foram extensivamente testados por Hashimoto (2011), eles forneceram um diagnóstico confiável para a confirmação da identidade das amostras, o que valida o diagnóstico LAMP.

5.3 Análise molecular das amostras com processamento simplificado

Nos últimos anos, vem crescendo as tentativas de simplificar ainda mais o LAMP para expandir e apresentar maiores vantagens em suas principais aplicações laboratoriais, em campo e *point-of-care testing*. Uma maneira de simplificá-la é processando ou preparando as amostras de maneiras alternativas à extração convencional de DNA ou utilizando amostras sem extração

de material genético (MORI; KANDA; NOTOMI, 2013; SOROKA; WĄSOWICZ; RYMASZEWSKA, 2021).

No ensaio de Tatulli et al. (2020), foi utilizado um protocolo alternativo de extração rápida de DNA que apresentou resultados tão específicos quanto as amostras extraídas de forma convencional. Os tecidos de lula *Loligo vulgaris* foram homogeneizados com o auxílio de um pilão plástica estéril, seguido da adição de InstaGene Matrix (Bio-Rad, München, Germany) (solução de extração rápida) de acordo com o protocolo da empresa. Desse modo, o material genético foi extraído em 15 minutos, sem a necessidade de purificação ou outros tratamentos antes de sua utilização na LAMP.

De maneira semelhante e em concordância com o obtido por Tatulli et al. (2020), no presente estudo, todas as amostras de *P. hypophthalmus* processadas por *Cell lysis solution* apresentaram amplificação completa, com alta concentração de *amplicons* (coloração amarela intensa), com os mesmos resultados colorimétricos que a amostra de DNA extraído correspondente. Todavia, os resultados de *P. mesopotamicus* não concordaram totalmente, uma vez que a amostra de DNA extraído obteve amplificação completa e as de *Cell lysis solution*, incompleta.

São poucos ou provavelmente ausentes os registros na literatura de utilização de amostras de tecido *in natura* de peixes para a determinação de espécies através da LAMP. Diante disso, o embasamento teórico para os testes executados de amplificação dessas amostras foi o ensaio de Fowler et al. (2021), cujas reações para a detecção de SARS-Cov 2 foram a partir de amostras retiradas diretamente de *swabs* naso e orofágicos diluídas em água livre de nuclease. Seus resultados confirmaram a sensibilidade e especificidade da técnica para a detecção de RNA viral nessas amostras, de maneira semelhante à análise de amostras de RNA extraído.

Com metodologia semelhante para o diagnóstico da Covid-19, o trabalho de Taki et al. (2021) traz resultados contrários aos de Fowler et al. (2021), demonstrando que há menor sensibilidade em reações com amostras não submetidas à extração de RNA, sendo, portanto, crítica para a eficácia na detecção de partículas virais em amostras de pacientes.

No presente trabalho, condizendo com os resultados de Fowler et al. (2021), a maioria das amostras de *P. mesopotamicus* de tecido *in natura* apresentaram os mesmos resultados colorimétricos que as amostras de DNA extraído. Para *P. hypophthalmus*, no entanto, todas as amostras de tecido *in natura* apresentaram amplificação completa, com alta concentração de *amplicons* (coloração amarela intensa), enquanto que as amostras correspondentes de DNA extraído foram amplificadas parcialmente, o que vai de encontro com o sugerido por Taki et al. (2021).

6 CONCLUSÕES

As principais conclusões do presente trabalho foram:

- A escolha dos genes e da região de anelamento dos *primers* na sequência-alvo é primordial para a seletividade e especificidade da reação LAMP;
- os resultados mostraram que a reação de LAMP colorimétrico não é espécie-específica para *P. hypophthalmus*;
- há a possibilidade de os *primers* desenhados para *P. mesopotamicus* serem espécie-específicos e
- foi observado que, no intervalo de dias, alguns tubos de coloração alaranjada mudaram para o amarelo, quando armazenados a temperatura ambiente.

Portanto, o presente estudo descreve a aplicação dessa metodologia de identificação de espécies de peixes como mais uma ferramenta genética para estudos aplicados à aquicultura, relacionados à orientação de programas de conservação e ao manejo adequado de plantéis reprodutores naturais e cultivados, bem como ao monitoramento da autenticidade genética na produção e comércio de produtos de peixes e propõe, pela primeira vez, o seu uso para identificação de *Piaractus mesopotamicus*, que no futuro pode ser aplicado pelos produtores de pisciculturas em campo para o monitoramento de suas matrizes genéticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLENDORF, Fred W.; HOHENLOHE, Paul A.; LUIKART, Gordon. Genomics and the future of conservation genetics. **Nature reviews genetics**, v. 11, n. 10, p. 697-709, 2010.

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. **Reviews in medical virology**, v. 31, n. 6, p. e2215, 2021.

ČLANJAK–KUDRA, Enida et al. An overview of most commonly used methods for detection of fish mislabeling. **Veterinaria**, v. 70, n. 2, p. 169-184, 2021.

EIKEN CHEMICAL Co., Ltd. Eiken Genome Site, 2005. The principal of LAMP method. Disponível em: <<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>>. Acesso em: 07 de fevereiro de 2022.

ERBER, Astrid Christine et al. Diagnosis of visceral and cutaneous leishmaniasis using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) protocols: a systematic review and meta-analysis. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, p. 1-16, 2022.

FAZCOMEX, 2022. Consulta à Nomenclatura Comercial do Mercosul. Disponível em: <<https://ncm.fazcomex.com.br/03043290-outros/>>. Acesso em: 24 de janeiro de 2022.

FOWLER, Veronica L. et al. A highly effective reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for the rapid detection of SARS-CoV-2 infection. **Journal of infection**, v. 82, n. 1, p. 117-125, 2021.

HA, Tran Thi Thuy et al. Genetic diversity in *Pangasius* spp. collected in Bangladesh based on mitochondrial cytochrome b gene sequence analysis. **Aquaculture Reports**, v. 17, p. 100351, 2020.

HASHIMOTO, Diogo Teruo. **Aplicação de marcadores moleculares no monitoramento genético de programas de hibridação interespecífica em pisciculturas brasileiras**. Tese de doutorado - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu. 2011.

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, n. 1-2, p. 49-53, 2011.

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.

HASHIMOTO, Diogo T. et al. Molecular identification of intergenus crosses involving catfish hybrids: risks for aquaculture production. **Neotropical Ichthyology**, v. 14, n. 2, 2016.

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

- KHUNTHONG, Sasiwarat et al. Rapid and sensitive detection of shrimp yellow head virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. **Journal of virological methods**, v. 188, n. 1-2, p. 51-56, 2013.
- KUNDAPUR, Rajesh R.; NEMA, Vijay. Loop-mediated isothermal amplification: Beyond microbial identification. **Cogent Biology**, v. 2, n. 1, p. 1137110, 2016.
- LI, Hui et al. Rapid identification of cod and oil fish components based on loop-mediated isothermal amplification. **Aquaculture**, v. 545, p. 737209, 2021.
- LI, Qiuping et al. Rapid identification of Atlantic salmon (*Salmo salar*) based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP) using self-quenching fluorogenic approach. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 105, p. 104224, 2022.
- LI, Xinqiong et al. One-step reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of porcine kobuvirus. **Journal of virological methods**, v. 207, p. 1-5, 2014.
- LI, Yanmei et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a novel rapid detection platform for pathogens. **Microbial pathogenesis**, v. 107, p. 54-61, 2017.
- MARTINS, Diego Galetti. **Genética aplicado no estudo da cadeia produtiva de Serrasalmídeos: identificação de espécies e híbridos comercializados**. Dissertação de mestrado - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Bauru. 2017.
- MORI, Yasuyoshi; KANDA, Hidetoshi; NOTOMI, Tsugunori. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development. **Journal of infection and chemotherapy**, v. 19, n. 3, p. 404-411, 2013.
- MORI, Yasuyoshi; NOTOMI, Tsugunori. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. **Journal of infection and chemotherapy**, v. 15, n. 2, p. 62-69, 2009.
- NAGAMINE, K[†]; HASE, Tesu; NOTOMI, TJMCP. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop *primers*. **Molecular and cellular probes**, v. 16, n. 3, p. 223-229, 2002.
- NAWATTANAPAIBOON, Kawin et al. Colorimetric reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) as a visual diagnostic platform for the detection of the emerging coronavirus SARS-CoV-2. **Analyst**, v. 146, n. 2, p. 471-477, 2021.
- NEW ENGLAND BIOLABS. **New England Biolabs**, 2022. WarmStart LAMP Kit (DNA & RNA) Protocol (E1700). Disponível em: <<https://www.nebiolabs.com.au/protocols/2016/08/15/warmstart-lamp-kit-dna-rna-protocol-e1700>> . Acesso em: 14 de fevereiro de 2022.
- NOTOMI, Tsugunori et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 12, p. e63-e63, 2000.
- NOTOMI, Tsugunori et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. **Journal of microbiology**, v. 53, n. 1, p. 1-5, 2015.

- NZELU, Chukwunonso O.; KATO, Hiroto; PETERS, Nathan C. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An advanced molecular point-of-care technique for the detection of Leishmania infection. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 11, p. e0007698, 2019.
- OSABUTEY, Angelina F. et al. Identification of a fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*)-specific gene and development of a rapid and sensitive loop-mediated isothermal amplification assay. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2022.
- OU, Hongling et al. Rapid detection of *Salmonella* based on loop-mediated isothermal amplification. **Ann. Palliat. Med.**, v. 10, p. 6850-6858, 2021.
- PADZIL, Faiz et al. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) as a Promising Point-of-Care Diagnostic Strategy in Avian Virus Research. **Animals**, v. 12, n. 1, p. 76, 2022.
- PORTO-FORESTI, F. et al. Genetic markers for the identification of hybrids among catfish species of the family Pimelodidae. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 29, n. 3, p. 643-647, 2013.
- 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.
- RAHMAN, SM Mazidur et al. Application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay targeting *cox1* gene for the detection of *Clonorchis sinensis* in human fecal samples. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 10, p. e0005995, 2017.
- RAN, Guangyao et al. Development of a rapid method for the visible detection of pork DNA in halal products by loop-mediated isothermal amplification. **Food analytical methods**, v. 9, n. 3, p. 565-570, 2016.
- SAKO, Yasuhito et al. Loop-mediated isothermal amplification method for a differential identification of human *Taenia* tapeworms. In: **Nucleic Acid Detection**. Humana Press, Totowa, NJ, 2013. p. 109-120.
- SOROKA, Marianna; WASOWICZ, Barbara; RYMASZEWSKA, Anna. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR?. **Cells**, v. 10, n. 8, p. 1931, 2021.
- SOUZA, Joice Teixeira et al. Comparação físico-química e sensorial de filés congelados de *Oreochromis niloticus* e *Pangasius hypophthalmus*. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e3489108583-e3489108583, 2020.
- SRIPHAIROJ, Kednapat; NA-NAKORN, Uthairat; KLINBUNGA, Sirawut. Species identification of non-hybrid and hybrid Pangasiid catfish using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Agriculture and Natural Resources**, v. 52, n. 1, p. 99-105, 2018.
- SUZUKI, Tomoya et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for quick identification of the Japanese salamander *Hynobius tokyoensis*. **Genes & Genetic Systems**, p. 21-00046, 2021.
- TAKI, Keisuke et al. SARS-CoV-2 detection by fluorescence loop-mediated isothermal amplification with and without RNA extraction. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 27, n. 2, p. 410-412, 2021.

TAMAKI, Yasuhiro et al. Molecular detection of lymph node metastases in breast cancer patients: results of a multicenter trial using the one-step nucleic acid amplification assay. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 8, p. 2879-2884, 2009.

TATULLI, Giuseppina et al. A rapid colorimetric assay for on-site authentication of cephalopod species. **Biosensors**, v. 10, n. 12, p. 190, 2020.

THO, Huynh Huu; TUYET, Nguyen Le Hoa; TOJO, Naoki. The effect of farm size on economic efficiency: a case study of Vietnamese pangasius farms. **Fisheries Science**, v. 87, n. 6, p. 915-926, 2021.

TORRES, Clinton et al. LAVA: an open-source approach to designing LAMP (loop-mediated isothermal amplification) DNA signatures. **BMC bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 1-7, 2011.

WANG, Danni; HSIEH, Yun-Hwa Peggy. The use of imported pangasius fish in local restaurants. **Food Control**, v. 65, p. 136-142, 2016.

WAYCOTT, B., 2015. *Pangasius* Farming: An Overview. Disponível em: <<https://thefishsite.com/articles/pangasius-farming-an-overview>>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2022.

WONG, Li Lian et al. Catfish species identification using Lab-on-chip PCR-RFLP. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 23, n. 1, p. 2-13, 2014.

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, 2020a.

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**, v. 13, n. 6, p. 1235-1245, 2020.

XIONG, Xiong et al. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid screening of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) in processed fish products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 102, p. 104038, 2021a.

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, 2021b.

XUE, Yangji et al. A novel loop-mediated isothermal amplification-lateral-flow-dipstick (LAMP-LFD) device for rapid detection of *Toxoplasma gondii* in the blood of stray cats and dogs. **Parasite**, v. 28, 2021.

YU, Shunji et al. Species identification of *felis* and *vulpes* by a novel loop-mediated isothermal amplification assay in fur products. **Journal of Engineered Fibers and Fabrics**, v. 14, p. 1558925018820720, 2019.