

SELEÇÃO GENÔMICA EM TILÁPIA: EXTRAÇÃO E A AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE RNA

LAÍS DOS SANTOS GONÇALVES¹; HADASSA GRABRIELA ORTIZ²; AMANDA WEEGE DA SILVEIRA MARTINS²; EDUARDO NUNES DELLAGOSTIN²; EDUARDO BIERHALS BLODORN²; VINICIUS FARIAS CAMPOS³

¹Universidade Federal de Pelotas – laisdsantosg@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – hortizhadassa@gmail.com; amandaweege98@gmail.com; edu.ndell@gmail.com; edu.bblodorn@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A piscicultura refere-se ao cultivo de peixes, principalmente de água doce, e é uma atividade praticada há muito tempo, existindo registros de que os chineses e egípcios já cultivavam vários séculos antes de nossa era. Apesar de ser uma técnica antiga, o cultivo de peixes é provavelmente o setor produtor de alimentos que mais se desenvolve atualmente, com uma taxa de crescimento de 10% ao ano, sendo este muito superior aos dos sistemas de produção de animais terrestres. Isso porque além de não causar danos ao meio ambiente, tem-se um menor gasto com tratamentos de doenças, é possível a criação de diferentes espécies no mesmo ambiente e o investimento inicial e tecnologias necessárias são relativamente de baixo custo, e em contrapartida tem-se produtividade elevada (ÁGUA E CONSUMO et al., 2018.).

Segundo um relatório emitido pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), o cultivo de peixes está em constante expansão e aprimoramento, e terá um aumento significativo de mais de 33% até 2030 na América Latina. Ainda, grande parte desse aumento decorre de países como o Brasil, onde a prática é privilegiada pelos recursos hídricos, presentes tanto na forma de bacias e reservas de água doce dentro do território nacional, como na extensa área litorânea do país, além, é claro, das condições climáticas favoráveis para criação de ampla variedade de espécies.

Dentre as espécies de peixes que são criadas comercialmente, as tilápias se destacam a nível nacional e mundial como carro-chefe da produção da piscicultura brasileira, no ano de 2018 foi gerada uma renda de US\$ 5,5 milhões em exportações de tilápia para os Estados Unidos. Segundo dados da Associação Brasileira de Piscicultura (Peixe BR) em 2018 foram produzidas 722,560 mil toneladas dessa espécie, representando 55,4% da produção brasileira de peixes.

As tilápias ganharam popularidade por uma série de vantagens, como: aceitar uma grande variedade de alimentos, apresentar uma resposta positiva à fertilização em viveiros, e possuir boas características organolépticas (RESENDE, GIOVANNI et al., 2018). No entanto, a tilapicultura ainda possui um obstáculo, pois as tilápias só podem ser cultivadas em regiões tropicais e em algumas regiões subtropicais, visto que sua cultura é altamente afetada pela sensibilidade a baixas temperaturas. Abaixo de 18°C, o seu sistema imunológico é suprimido, e não sobrevivem a temperaturas inferiores a 10°C por mais de alguns dias, causando um déficit na produção durante o inverno (RECLOST AMBIENTAL et al., 2017.).

Segundo estudos moleculares nessa espécie a característica de resistência ao frio está relacionada a fatores epigenéticos (BARCELOS, LEONARDO et al., 2019.), dentre eles destaca-se o miRNA, uma classe não codificante de RNAs

que possuem um importante papel de regulação na expressão gênica, tanto em plantas quanto em animais, através da sua interação com as regiões 3' e 5' não traduzidas dos RNAs promovendo a degradação ou repressão da tradução de moléculas-alvo de RNA mensageiro (PACHECO, CRISTIANE et al., 2012). Baseado nestes conhecimentos, o atual trabalho tem como objetivo utilizar os miRNAs como marcadores epigenéticos para seleção genômica de tilápias tolerantes ao frio, visto que isso possibilitaria uma expansão produtiva da tilapicultura a nível nacional, trazendo mais emprego, renda e tecnologia para o setor.

2. METODOLOGIA

Para realizar o experimento escolheu-se usar tilápias (alevinos) da linhagem Supreme, os animais foram obtidos na Região Sul e transferidos para o Laboratório de Fisiologia Aplicada a Aquicultura (UFPEL) e mantidos em aclimação durante uma semana em sistema fechado de recirculação e uma temperatura de 24°C e fotoperíodo de 12h. Os procedimentos envolvendo animais foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPEL.

Quando os indivíduos atingiram 10g, eles foram anestesiados e realizou-se a coleta de sangue para posterior avaliação do nível e expressão dos miRNAs em condições normais (controle). Após 48h, os peixes foram submetidos ao teste de temperatura crítica mínima (CTmin) e nova coleta de sangue para identificação dos indivíduos mais tolerantes as baixas temperaturas. Para avaliar o CTmin, cada peixe foi individualmente exposto em um recipiente metálico de 10L dotado com um termômetro digital, no qual houve uma redução de temperatura (-0,3°C/min) a partir da temperatura de aclimação. Durante a exposição, a cada minuto a temperatura foi registrada, e a CTmin foi determinada quando houve perda de equilíbrio do indivíduo.

Foi realizada a extração de RNA total a partir das amostras de sangue, com o uso de TRIzol LS e colunas RNEasy (Qiagen, EUA) para a posterior avaliação dos níveis de miRNAs. Avaliou-se a integridade e concentração do RNA em um equipamento Agilent 4200 TapeStation (Agilent Technologies, EUA) e em um espectrofotômetro de luz ultra-violeta (NanoVue, Life Sciences).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da metodologia descrita observou-se que os CTmin individuais de tilápia determinados apresentaram média de $8,6 \pm 0,16^{\circ}\text{C}$. Os indivíduos menos tolerantes ao frio, com maior valor CTmin ($9,18 \pm 0,08^{\circ}\text{C}$), e os indivíduos mais tolerantes ao frio, com menor valor CTmin ($7,94 \pm 0,26^{\circ}\text{C}$) foram selecionados para integrar dois grupos diferentes ($p < 0,05$) em análises posteriores.

As amostras de RNA extraídas apresentaram integridade (RNA integrity number equivalent – RINe) aproximadas de 9, concentrações satisfatórias, $545,6 \pm 42,8 \text{ ng/}\mu\text{L}$, e altos padrões de pureza.

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados encontrados nesse trabalho, conclui-se que tilápias mais e menos tolerantes as baixas temperaturas podem ser individualizadas pelo teste de CTmin e que concentrações de RNA total de sangue puderam ser obtidas em quantidade e qualidade suficientes e necessárias para a etapa de sequenciamento. O grupo de pesquisa tem como perspectiva a utilização de um



método inovador fundamentado em seleção genômica utilizando marcadores epigenéticos miRNAs que podem ser usados para selecionar animais tolerantes ao frio. Visando a sua aplicação no setor produtivo, expandindo significativamente a produção de tilápias no Brasil e consequentemente a economia do país.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARCELOS, L.; FAGUNDES, M. **Policultivo de Jundiás, Tilápias e Carpas: Uma alternativa de produção para a piscicultura rio-grandense**. Passo Fundo. UPF Editora, 2012.

QIANG, J.; CUI, YT.; TAO, FY.; BAO, WJ.; He, J.; LI, XH.; XU, P.; SUN, LY. Physiological response and microRNA expression profiles in head kidney of genetically improved farmed tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*) exposed to acute cold stress. **Scientific Reports**. v.8, n.172, 2018.

CAMPOS, V.; URTIAGA, G.; GONÇALVES, B.; COLLARES, T.; DESCHAMPS, J. MicroRNAs e seu papel no desenvolvimento embrionário. **Ciência Rural**. V. 41, n. 1, Santa Maria, 2011.

MILITÃO, E.; SOUZA, C.; COSTA S.; FERNANDES, W. Custo de Produção de Tilápia (*Oreochromis spp.*) em Tanques-rede em Ilha Solteira, Estado De São Paulo. In: **CONGRESSO DA SOBER**, 45., São Paulo, 2007.

O comportamento dos peixes em época fria. Reclost Ambiental, 5 maio. 2017. Especiais. Acessado em 12 setembro. 2019. Online. Disponível em: <https://www.recolastambiental.com.br/blog/uncategorized/o-comportamento-dos-peixes-em-epoca-fria/>

Criação de peixes em tanques quais as vantagens. Blog Sansuy, 3 maio. 2017. Especiais. Acessado em 11 setembro. 2019. Online. Disponível em: www.aguaconsumo.com.

Tilápia leva piscicultura brasileira a R\$ 5 bilhões de faturamento. Globo Rural, 17 fev. 2019. Especiais. Acessado em 11 setembro. 2019. Online. Disponível em: <https://revistagloborural.globo.com/Noticias/Criacao/Peixe/noticia/2019/02/tilapia-leva-piscicultura-brasileira-r-5-bilhoes-de-faturamento.html>.

Colpani piscicultura. Piscicultura Águas Claras. Especiais. Acessado em 9 setembro. 2019. Online. Disponível em: <https://www.grupoaguasclaras.com.br/colpani-piscicultura>.

Produção de tilápia: vantagens e aspectos legais. Curso Online de Piscicultura. Especiais. Acessado em 12 setembro. 2019. Online. Disponível em: <https://www.uov.com.br/cursos-online-piscicultura/artigos/producao-de-tilapia-vantagens-e-aspectos-legais>.