

## Medição relativa de telômeros como biomarcador molecular em *Ancistrus* sp. (Família *Loricariidae*)

### Relative telomere measurement as a molecular biomarker in *Ancistrus* sp. (Family *Loricariidae*)

Jeise Ferreira Costa<sup>1</sup>, Douglas Fernando Zimmer<sup>2</sup>, Mariele Zamprogna<sup>3</sup>, Nédia de Castilhos Ghisi<sup>4</sup>

#### RESUMO

A análise do comprimento de telômeros em peixes é um biomarcador molecular com grande potencial para representar a exposição a contaminantes estressores. Telômeros são estruturas nas extremidades dos cromossomos que protegem o DNA e regulam a senescência celular. *Ancistrus* sp., é pertencente à família Loricariidae, é utilizado como indicador ambiental em ecossistemas aquáticos e ocorre na bacia do rio Iguaçu. Foram coletadas 53 amostras de *Ancistrus* sp. nos afluentes do Rio Iguaçu, congeladas a -80°C para posterior análise. A extração de DNA foi realizada com o Kit Wizard Promega®, seguida de qPCR para medir telômeros em relação ao gene GAPDH. Resultados indicaram que a região telomérica apresentou um CT menor que o gene GAPDH, sugerindo possível encurtamento dos telômeros. Valores abaixo de 1,911 podem indicar isso. O monitoramento da exposição a contaminantes é fundamental para pesquisa e conservação de ecossistemas aquáticos, especialmente na ecotoxicologia, visto que poluentes podem afetar os telômeros e a qualidade de vida das espécies. A medição de telômeros fornece biomarcador molecular valioso para avaliar o impacto ambiental em peixes neotropicais e contribuir para sua preservação.

**PALAVRAS-CHAVE:** Telômeros; Medição; DNA.

#### ABSTRACT

The analysis of telomere length in fish is a molecular biomarker with great potential for representing exposure to stressful contaminants. Telomeres are structures at the ends of chromosomes that protect DNA and regulate cellular senescence. *Ancistrus* sp., which belongs to the Loricariidae family, is used as an environmental indicator in aquatic ecosystems and occurs in the Iguaçu River basin. Fifty-three samples of *Ancistrus* sp. were collected from the tributaries of the Iguaçu River and frozen at -80°C for later analysis. DNA was extracted using the Wizard Promega® Kit, followed by qPCR to measure telomeres in relation to the GAPDH gene. Results indicated that the telomeric region had a lower CT than the GAPDH gene, suggesting possible telomere shortening. Values below 1.911 may indicate this. Monitoring exposure to contaminants is fundamental for research and conservation of aquatic ecosystems, especially in ecotoxicology, since pollutants can affect telomeres and the quality of life of species. Measuring telomeres provides a valuable molecular biomarker for assessing environmental impact on neotropical fish and contributing to their preservation.

**KEYWORDS:** telomere; measurement; DNA.

<sup>1</sup> Bolsista da Fundação Araucária. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: jeise@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes:0623475800589102

<sup>2</sup> Bolsista mestrando da CAPES. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: zimmer.2017@alunos.utfpr.edu.br ID Lattes: 8637118694319200

<sup>3</sup> Voluntária do Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica (PIVIC). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. Email: marielezamprogna@gmail.com. ID Lattes: 2118008510708531

<sup>4</sup> Docente no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: nediahghisi@gmail.com. ID Lattes: 4542801151720873

## INTRODUÇÃO

*Ancistrus sp.* é uma espécie pertencente à família Loricariidae, a qual possui mais quatro espécies. Os peixes representativos destas subfamílias são conhecidos popularmente como cascudos ou acaris, na região amazônica, e apresentam o corpo dorso/ventralmente achatado e coberto por placas ósseas, possuem dentes dérmicos chamados odontodes e se alimentam de algas e pequenos invertebrados presentes nos fundos de rios e lagos (BRITSKI, 1972; ISBRUCKER, 1980; BRITSKI, et al., 1999). A espécie é detritívora, ou seja, que se alimenta de restos vegetais e animais, sendo um excelente bioindicador da qualidade ambiental.

A crescente escalada de poluentes que entram em contato com ambientes aquáticos é uma grande fonte de preocupação nos meios científicos, uma vez que os efeitos individuais, bem como seus possíveis efeitos sinérgicos, contribuem para o encurtamento dos telômeros, por isso o comprimento dos telômeros pode ser avaliado como um biomarcador para contaminantes ambientais. Os telômeros são estruturas presentes nas extremidades dos cromossomos, sendo constituídos de segmentos repetitivos de DNA não codificante (BLACKBURN, 2017); possuem uma grande importância, pois atuam na proteção do DNA e na regulação da senescência celular retardando o encurtamento cromossômico e a eventual perdas de regiões de genes codificantes a cada divisão celular (SIMIDE et al., 2016).

Para a mensuração de telômeros, várias técnicas já foram descritas, entretanto, a técnica qPCR constitui o método mais utilizado atualmente, pois apresenta um custo relativamente baixo se comparada a outras técnicas utilizadas para mensuração de telômeros, podendo ser realizada utilizando-se de pequenas quantidades de DNA (LIN et al., 2019). O estudo sobre a mensuração de telômeros é de suma importância para obter uma padronização como biomarcador sobre espécies distintas. A mensuração de telômeros já foi bem padronizada para seres humanos (GARDNER et al., 2014). A pesquisa teve como objetivo central mensurar o comprimento relativo dos telômeros comparados ao gene endógeno GAPDH para avaliar se há encurtamento dos telômeros por possível exposição a contaminantes ambientais.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS:

Para o desenvolvimento deste estudo, primeiramente foi aprovado no Comitê de Ética da UTFPR sob o protocolo n°2022-05. Posteriormente foram coletadas amostras de músculo de 53 indivíduos da espécie *Ancistrus sp.* em afluentes do Rio Iguaçu. Todos apresentando entre 4 a 10 cm de comprimento. Foi utilizada a técnica da pesca elétrica para a captura dos indivíduos, sendo eutanasiados com benzocaína e retirado um fragmento de músculo para extração do DNA. As amostras foram congeladas a uma temperatura de -80° até o preparo, para sua conservação.

### EXTRAÇÃO DE DNA:

Após o descongelamento das amostras utilizamos o Kit Wizard Promega® para extração do material genético. O kit é baseado em um processo de quatro etapas, a

primeira envolve a lise da membrana celular e nuclear, seguida de uma etapa de digestão do RNA, em seguida ocorre a precipitação e a remoção das proteínas e por último a precipitação e concentração do DNA genômico (PROMEGA, 2009). Realizou-se a técnica de qPCR para prospectar a medida relativa dos telômeros. Na etapa da qPCR foram escolhidos dois *Primers*. A medição relativa ocorre com base na medição de um gene constitutivo, em nossa pesquisa utilizamos o gene GAPDH.

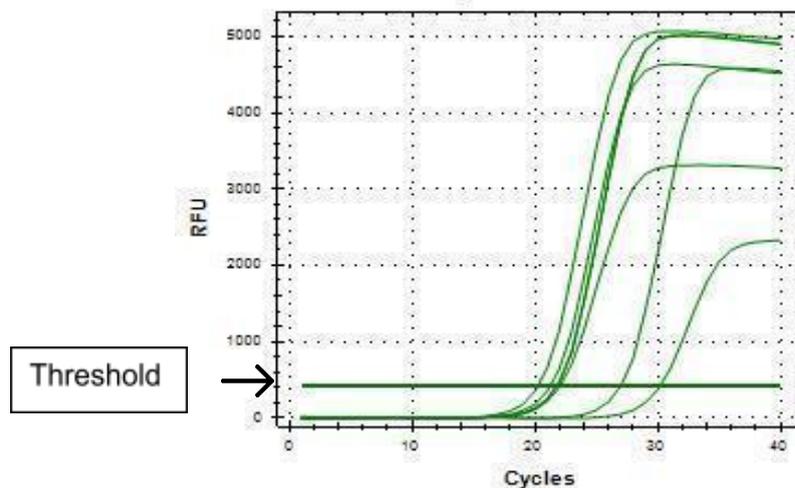
## AMPLIFICAÇÃO ATRAVÉS DE qPCR

A mensuração do tamanho telomérico é realizada de forma relativa a um gene endógeno. Em nossa pesquisa utilizamos o gene GAPDH. A amplificação da região telomérica e de gene endógeno foram realizadas no aparelho CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System em uma reação final contendo de 20  $\mu$ L. A verificação do tamanho relativo é baseada nos valores de Cts (cycle threshold) fornecidas pelo aparelho. Após a amplificação utilizamos da metodologia descrita por CAWTHON (2002).

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

A média dos Cqs (Cycle of quantification/qualification) de telômeros apresentou um valor de 22,9 ciclos, enquanto a média de Cqs do gene GAPDH foi de 28,7 ciclos (Fig. 1), ou seja a curva de amplificação dos telômeros passou o limiar (Threshold) com 22,9 ciclos. Observa-se uma diferença de cerca de 5,7 ciclos entre a amplificação dos telômeros e do gene endógeno, demonstrando uma detecção mais precoce da região telomérica em relação ao gene de referência. Isto indica que os telômeros possuem uma região de anelamento menor que o gene GAPDH.

Figura 1 – Amplificação da região telomérica em qPCR através dos *primers*



Fonte: Douglas Fernando Zimmer, 2023.

Presume-se que os telômeros de *Ancistrus* sp. estão reduzidos, podendo ser um indicativo de que estes indivíduos estão expostos a contaminantes tóxicos que podem limitar a expressão de genes localizados próximo aos telômeros ou causar percas

genômicas. É importante destacar que as amostras foram coletadas em rios que são utilizados para pesca e recreação, e os mesmos podem ainda estar recebendo contaminantes de fontes antrópicas ou agrícolas (plantações de monocultura), isso traz uma grande preocupação para com o meio ambiente e conseqüentemente com o ser humano, pela exposição a partir da cadeia trófica.

Análises químicas da água dariam uma possível causa deste encurtamento dos telômeros e trariam maiores discussões para este trabalho. Estudos futuros podem padronizar este biomarcador para outras espécies e comparar o comprimento de telômeros com contaminantes específicos, estabelecendo padrões de resposta e outros genes de referência.

## CONCLUSÃO

Os telômeros podem ser utilizados como biomarcadores moleculares de exposição a contaminantes estressores. *Ancistrus* sp. coletados em afluentes do Rio Iguaçu apresentaram encurtamento nos telômeros em relação aos genes endógenos indicando que os peixes estão expostos a contaminantes possivelmente tóxicos. O gene GAPDH comportou-se como um bom gene endógeno.

## Agradecimentos

Gostaria de registrar meu agradecimento à Fundação Araucária e a CNPq pelo financiamento concedido para a realização desse projeto, a UTFPR - Campus Dois Vizinhos por disponibilizar os laboratórios para que a pesquisa fosse realizada, ao Laboratório de Multiusuários de Análises Biológicas e Biologia Molecular (BIOMOL) a minha orientadora Dr. Nédia de Castilhos Ghisi e ao meu coorientador e futuro mestre Douglas Fernando Zimmer por suas orientações valiosas durante todo o projeto, e também a todos os colegas de projeto que contribuíram de alguma forma com tudo isso.

## Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

BLACKBURN, E.H. O segredo está nos telômeros: receita revolucionária para manter a juventude e viver mais e melhor. São Paulo: Planeta. 1. ed, 2017.

BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo: sistemática. In: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Poluição e piscicultura. São Paulo: CibiPU, 1972. p. 79-108.

BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. Manual de identificação de peixes do Pantanal Mato-grossense. Brasília: EMBRAPA- SPI, 1999.p.184.

CAWTHON, R. M. Medição de telômeros por PCR quantitativo, *Pesquisa de ácidos nucleicos*, v. 30, ed.10, p. 47, 2022.

GARDNER, M. et al. Gender and telomere length: Systematic review and metaanalysis. *Experimental Gerontology*, v. 51, p. 15–27, 2014.

ISBRUCKER, I. J. H. Classification and catalogue of the mailed Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Versl. Tech. Gegevens*, v. 22, p. 1-181, 1980.

LIN, J. et al. Telomere length measurement by qPCR – Summary of critical factors and recommendations for assay design. p. 271–278, 2019.

SIMIDE, R. et al. Age and Heat Stress as Determinants of Telomere Length in a Long-Lived Fish , the Siberian Sturgeon. *Physiological and Biochemical Zoology*, v. 89, n. 5, 2016.