



Desenvolvimento de protocolo para análise de comprimento relativo de telômeros em peixes da espécie *Corydoras* spp. (Ordem Siluriforme)

Development of a protocol for the analysis of relative telomere length in fish of the species *Corydoras* spp. (Order Siluriforme)

Marieli Zamprogna¹, Douglas Fernando Zimmer², Jeise Ferreira Costa³, Nédia de Castilhos Ghisi⁴

RESUMO

Bioindicadores, de uma maneira geral, são seres vivos de natureza diversa utilizados para avaliação de qualidade ambiental. Com a ação de diversos poluentes lançados no meio ambiente ao longo do tempo, danos genotóxicos podem ocorrer em animais que vivem nesses ecossistemas. Um desses danos moleculares que podem vir a ocorrer é o encurtamento de telômeros, causando assim, a eventual perda de regiões de genes codificantes a cada divisão celular. Dessa forma, buscando analisar possíveis alterações no genoma de espécies afetadas pela poluição da Bacia do Rio Iguçu-PR, foram coletados peixes da espécie *Corydoras* spp. (ordem Siluriforme). Com isso, o objetivo desta pesquisa é padronizar um método para mensurar o comprimento relativo dos telômeros de *Corydoras* spp. e fazer comparações do tamanho telomérico de indivíduos coletados em diferentes pontos da bacia hidrográfica. Após a testagem desse método, foi possível concluir que valores abaixo de 7,555 podem significar alteração em telômeros, resultado de estresse oxidativo causados por poluentes presentes no meio em que o bioindicador está exposto. Posteriormente, essa pesquisa irá colaborar em futuros ensaios em ecotoxicologia por inferir sobre o tamanho relativo dos telômeros, além de poder fazer futuras comparações em diferentes espécies e regiões de ecossistemas aquáticos.

PALAVRAS-CHAVE: *Corydoras* spp.; genotoxicidade; poluição; telômeros.

ABSTRACT

Bioindicators, in general, are living beings of various kinds used to assess environmental quality. With the action of various pollutants released into the environment over time, genotoxic damage can occur in animals living in these ecosystems. One of these molecular damages that can occur is the shortening of telomeres, thus causing the possible loss of coding gene regions at each cell division. In order to analyze possible alterations in the genome of species affected by pollution in the Iguçu River Basin in Paraná, fish of the species *Corydoras* spp. (order Siluriforme) were collected. The aim of this research is to standardize a method for measuring the relative telomere length of *Corydoras* spp. and to compare the telomere length of individuals collected at different points in the river basin. After testing this method, it was possible to conclude that values below 7.555 can mean altered telomeres, the result of oxidative stress caused by pollutants present in the environment in which the bioindicator is exposed. Subsequently, this research will contribute to future ecotoxicology tests by inferring the relative size of telomeres, as well as being able to make future comparisons in different species and regions of aquatic ecosystems.

KEYWORDS: *Corydoras* spp.; genotoxicity; pollution; telomeres.

¹ Voluntária do Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica (PIVIC). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: marielizamprogna@gmail.com. ID Lattes: 2118008510708531.

² Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: zimmer.2017@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 8637118694319200.

³ Bolsista da Fundação Araucária. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: jeise@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 0623475800589102.

⁴ Docente no Curso de Ciências Biológicas. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: nediaghisi@utfpr.edu.br.com. ID Lattes: 4542801151720873.



INTRODUÇÃO

O Paraná é o segundo maior consumidor de agrotóxicos do Brasil, com um volume total de 95.286,8 toneladas consumidas no ano de 2019, de acordo com o Sistema de Monitoramento do Comércio e Uso de Agrotóxicos do Estado do Paraná (SIAGRO). Independente da aplicação ser por pulverização aérea ou de maneira direta, as partículas de agrotóxicos atingem o solo. Estes produtos passam então por diversos processos químicos, que determinarão seu comportamento, além do alto potencial de se mover e depositar-se nas plantas, solos e água, resultando em acúmulos nos ecossistemas envolvidos (MELLO ET AL, 2019).

A bacia do Rio Iguaçu de grande importância social, ecológica e econômica, tem sido exposta à grandes níveis de agrotóxicos e diversos poluentes ao longo de sua bacia. Dessa forma, vê-se a necessidade de analisar a qualidade da água, uma forma de verificação é por meio de bioindicadores, termo que pode ser definido como a escolha de espécies dada sua sensibilidade ou tolerância a diversos tipos de alterações ambientais, geralmente causadas por ações antropogênicas (FREITAS, 2009). Com isso, será possível verificar por meio de respostas moleculares os altos níveis de poluentes desta bacia hidrográfica e os danos causados em espécies que vivem nesse ecossistema.

Por isso, foram coletados peixes da espécie *Corydoras* spp. (Ordem Siluriforme), peixe nativo e que se caracteriza como bioindicador. No total houveram 4 diferentes pontos de coleta na Bacia do Rio Iguaçu, que tiveram como intuito a coleta de peixes para se desenvolver um protocolo de análise de mensuração relativa de telômeros dessa espécie.

Visto que uma ampla gama de poluentes tem potencial genotóxico sobre os telômeros (ZIMMER, 2021), se faz necessário a análise dessa porção gênica de peixes que vivem na bacia do rio Iguaçu, como o *Corydoras* spp. A fim de demonstrar possíveis danos moleculares causadas por contaminantes e que podem ser correlacionadas com respostas que seriam observadas em humanos e em outros animais.

MATERIAIS E METÓDOS

A metodologia descrita a seguir foi previamente submetida e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da Universidade Tecnológica Federal



do Paraná – *Campus Dois Vizinhos (UTFPR-DV)*, sob o parecer nº 2022-63/2022. Além disso, essa metodologia é uma adaptação do protocolo de Zimmer, 2021.

PONTOS DE COLETA

Para realização desta pesquisa foram selecionadas duas localidades situadas dentro da bacia do rio Iguaçu. Uma delas no Parque Nacional do Iguaçu no município de Céu Azul e na região metropolitana de Curitiba. Sendo que, em Curitiba foram designados três rios afluentes do rio Iguaçu, situados em diferentes ambientes e contextos de uso e ocupação de solo.

COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

O bioindicador selecionado neste estudo foram peixes da espécie *Corydoras* spp. Foram capturados 20 indivíduos em cada ponto de coleta de três regiões metropolitanas de Curitiba e 11 indivíduos no ponto do Parque Nacional do Iguaçu totalizando 71 peixes coletados.

O método empregado de captura foi a pesca elétrica, onde através de um gerador elétrico de potencial de 220V uma corrente elétrica alternada era aplicada na água. A corrente elétrica aplicada não matava os animais, apenas os tornava inconscientes por alguns instantes. Os indivíduos de interesse foram capturados e alocados em um recipiente com água do próprio rio até a etapa seguinte de triagem de cada indivíduo.

Para a triagem, os indivíduos eram previamente anestesiados com uma dose subletal de benzocaína e em seguida foi colhido informações como peso e tamanho do animal. Posterior a essa etapa, os indivíduos eram alocados em outro recipiente contendo dose letal do anestésico benzocaína 100mg/L.

MENSURAÇÃO RELATIVA DE TELÔMEROS

Para a pesquisa de mensuração telomérica foi seccionado uma pequena fração de músculo de cada indivíduo e alocados em tubos criogênicos. Uma vez nos tubos, o material biológico foi armazenado em ambiente congelado e rapidamente transferidos para um



galão contendo nitrogênio líquido a uma temperatura em torno de $-195,8^{\circ}\text{C}$ e posteriormente transferidos a um ultrafreezer a temperatura de -80°C até a etapa de extração de DNA.

Após as amostras serem previamente retiradas do ultrafreezer, foi utilizado o protocolo de extração do kit Wizard Promega® para a obtenção do DNA. O kit é baseado em um processo de quatro etapas, a primeira envolve a lise das membranas celular e nuclear, seguida de uma etapa de digestão do RNA. Após essa etapa ocorre a precipitação e a remoção das proteínas e por fim a precipitação e concentração do DNA genômico (PROMEGA, 2009).

A quantificação do DNA foi realizada com o auxílio do aparelho Qubit® 4.0 Fluorometer da empresa Thermo Fisher Scientific Inc, seguindo o protocolo determinado pelo kit de ensaio Qubit® dsDNA Broad.

Para a realização da PCR quantitativa foi feita a utilização do aparelho Biorad CFX96 Touch RealTime PCR Detection System. Uma reação final de 20 ul foi preparada para a reação de amplificação da região telemétrica e do gene endógeno GAPDH. Ao final de cada ciclo ocorreu a leitura dos tubos.

A medição relativa do telômero foi feita com base no protocolo descrito por CAWTHON (2002). Nesta metodologia é utilizado o valor de Ct (*Cycle Threshold*) ou seja, o número de ciclos necessários para que a detecção do sinal de fluorescência fosse significativa no termociclador. Para se realizar a medição, utiliza-se a razão T/S onde T representa os Telômeros e S representa o gene endógeno.

Como o princípio da PCR baseia-se no fato da duplicação de DNA por ciclo, uma forma mais apropriada de expor a diferença entre a média de Cts teloméricos e do gene endógeno é através da fórmula (1):

$$\left[\frac{2^{Ct_{\text{telômeros}}}}{2^{Ct_{\text{SS}}}} \right]^{-1} = 2^{-\Delta Ct} \quad (1)$$

Dessa forma é possível verificar a quantidade de ciclos a mais que o gene endógeno precisou para emitir sinais de fluorescência semelhantes aos de telômero.

Todas as variáveis foram previamente analisadas quanto a normalidade de resíduos e homogeneidade das variâncias por teste de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. As



análises de tamanho de telômero foram realizadas por ANOVA bifatorial seguido de teste de Tukey. Para todos os procedimentos se utilizou o software Statística 10.0.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após a testagem desse método em cinco amostras, foi possível obter a padronização com sucesso tanto para telômeros quanto para o gene endógeno, com *cycle threshold* (Ct) médio de 18,829 e 26,384, respectivamente. Com o valor dos Cts médios foi possível calcular o valor de ΔCt , o qual fornece a diferença na quantidade de moléculas, em ciclos, da região alvo e do gene endógeno. A diferença entre a região telomérica de *Corydoras* sp. e o gene endógeno GAPDH é de 7,555, ou seja, são necessários 7,555 ciclos a mais para iniciar o sinal de amplificação do gene GAPDH. A partir da obtenção deste valor, pode-se concluir que valores abaixo de 7,555 podem significar alteração em telômeros.

Com isso, será possível ver modificações moleculares em diferentes espécies de peixes causadas por estresse oxidativo. Além de que pelo peixe ser um bioindicador, pode-se analisar o nível de poluição em bacias hidrográficas e se existe diferença de danos causados em animais de diferentes localidades de comparação. Dessa forma, abrangendo nossos conhecimentos sobre danos genotóxicos causados por substâncias presentes nos rios que podem causar danos aos humanos, animais e ao ecossistema.

CONCLUSÃO

Com essa pesquisa pode-se concluir que a mesma metodologia desenvolvida para *Rhamdia quelen* pode ser adaptada com sucesso para *Corydoras* spp. Desta forma, este protocolo pode ser difundido e aplicado em diversos laboratórios e instituições como um biomarcador para avaliar os efeitos de poluentes no material genético de animais nativos neotropicais.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a CPNP por financiar esse projeto, a UTFPR por ceder oportunidades, o espaço e os equipamentos, ao Laboratório Multiusuário de Análises



Biológicas e Biologia Molecular (BioMol), ao grupo Ecotoxigen e a todos os envolvidos direta ou indiretamente que de alguma forma dedicaram sua atenção e tempo a esse projeto.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

CAWTHON, R. M. Telomere measurement by quantitative PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 10, p. 29–50, 2002.

Freitas, C. E. C., & Siqueira-Souza, F. K. O uso de peixes como bioindicador ambiental em áreas de várzea da bacia amazônica. **Revista Agrogeoambiental**, Minas Gerais, ago. 2009.

MELLO, Fabiola Azevedo; FAGIANI, Marcela de Andrade; ROSSI, Renata Calciolari Rossi e; NAI, Gisele Alborghetti. **Agrotóxicos: Impactos ao meio ambiente e à saúde humana**. Colloq Vitae, v. 11, n. 2, p. 37-46, mai-ago 2019. Disponível em: Acesso em 28 ago. 2023.

PARANÁ. **PEVASPEA 2020-2023: Plano de Vigilância e Atenção à saúde de Populações Expostas aos Agrotóxicos do Estado do Paraná**. Curitiba: SESA, 2021. Disponível em: https://saude.mppr.mp.br/arquivos/File/Programa_Agrotoxicos/Plano_2020-2023.pdf. Acesso em: 31 de ago. 2023.

ZIMMER, D. F. **Desenvolvimento de um biomarcador molecular baseado no Comprimento de telômeros em peixes da espécie *Rhamdia quelen* (Ordem Siluriforme)**. 2021. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso). Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Dois Vizinhos, 2021.