



Testagem de primers para mensurar telômeros e a toxicidade de poluentes em peixes

Testing of primers to measure telomeres and the toxicity of pollutants in fish

Sandrieli Gonçalves*, Nédia de Castilhos Ghisi[†], Douglas Fernando Zimmer[‡]

RESUMO

A cromatina encontrada nos telômeros desempenha a função de proteção contra o encurtamento dos cromossomos. Isto tem grande importância, pois com as divisões celulares os telômeros sofrem senescência replicativa, o que resulta no encurtamento natural, podendo ocasionar danos no DNA. Os peixes são organismos vertebrados, assim como os humanos, deste modo são ótimos bioindicadores contra a toxicidade de substâncias poluentes. Desta forma, realizou-se o bioensaio com peixes juvenis e alevinos de *Rhamdia quelen* expostos ao herbicida 2,4-D e efluente têxtil (tratado e bruto). O objetivo deste estudo foi testar diferentes primers para amplificar a amostra de DNA de peixes da espécie *R. quelen*, inicialmente por PCR convencional, e após estabelecido, por PCR – RT, para padronizar um teste de mensuração de comprimento dos telômeros em peixes. A exposição aos poluentes ocorreu em épocas diferentes, ambos os projetos foram aprovados pelo comitê de ética da instituição. Inicialmente, os animais passaram pelo período de aclimação, posteriormente, ficaram expostos durante sete dias no método semi-estático. Após este período foi realizada a coleta do músculo dos animais, este material foi usado para realizar a extração do DNA, quantificação e amplificação através da PCR. Os resultados foram satisfatórios para a extração e quantificação do material genético, porém a amplificação não ocorreu da forma desejada. Portanto, novas tentativas são necessárias. A amplificação do DNA de uma espécie que não possui primers desenhados é complicada, pois é preciso passar por várias tentativas e erros até obter resultados satisfatórios e instituir um protocolo.

Palavras-chave: *Rhamdia quelen*, 2,4-D, efluente têxtil, genotoxicidade, biologia molecular

ABSTRACT

The chromatin found in telomeres plays a protective role against chromosome shortening. This is of great importance, as with cell divisions, telomeres undergo replicative senescence, which results in natural shortening, which can cause DNA damage. Fish are vertebrate organisms, just like humans, so they are excellent bioindicators against the toxicity of polluting substances. Thus, the bioassay was carried out with juvenile fish and fingerlings of *Rhamdia quelen* exposed to 2,4-D herbicide and textile effluent (treated and raw). The aim of this study was to test different primers to amplify the DNA sample from fish of the species *R. quelen*, initially by conventional PCR, and after established, by PCR - RT, to standardize a test for measuring telomere length in fish. Exposure to pollutants occurred at different times, both projects were approved by the institution's ethics committee. Initially, the animals went through the acclimatization period, later, they were exposed for seven days in the semi-static method. After this period, the animals' muscle was collected, this material was used to perform the DNA extraction, quantification and amplification through PCR. The results were satisfactory for the extraction and quantification of genetic material, but the amplification did not occur as desired. Therefore, further attempts are required. The amplification of DNA from a species that does not have designed primers is complicated, as it takes several trials and errors to obtain satisfactory results and institute a protocol.

Keywords: *Rhamdia quelen*, 2,4-D, textile effluent, genotoxicity, molecular biology

1 INTRODUÇÃO

* Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, Paraná Brasil; sandrieli@outlook.com

[†] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, Paraná Brasil; nediaghisi@utfpr.edu.br

[‡] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, Paraná Brasil; zimmer.2017@alunos.utfpr.edu.br



Os telômeros constituem a cromatina nas extremidades dos cromossomos, essas que realizam a proteção contra o reconhecimento do cromossomo como uma quebra de DNA (VALUCHOVA *et al.*, 2017). Desta forma, são essenciais para evitar o encurtamento crítico dos cromossomos lineares (HIGA; FUJITA; YOSHIDA, 2017). Porém, a cada divisão celular se perde um pouco dos telômeros devido a senescência replicativa ou o dano telomérico causado pelo atrito cumulativo (SOBINOFF; PICKETT, 2017).

Com o encurtamento crítico dos telômeros o ciclo celular é suspenso, isto ocorre pela ativação de mecanismos que geram respostas contra danos do DNA (LI, J. S. Z.; DENCHI, 2018). Há indícios que o comprimento dos telômeros em adultos desencadeiem respostas de estresse fisiológico do passado e presuma a morbimortalidade subsequente, independentemente da idade cronológica (NUSSEY *et al.*, 2014). Demais estudos sugerem que o encurtamento dos telômeros é uma variável relacionada a obesidade, tabagismo, baixa posição econômica e aumento da mortalidade (GARDNER *et al.*, 2014). Desta forma, pesquisas acerca do comprimento do telômeros indicam que ele pode representar índices de idade biológica, isto porque conforme os anos passam e as células se dividem, eles reduzem de tamanho.

Considerando que os peixes são organismos vertebrados, assim como os humanos, ao serem expostos a situações de estresse uma resposta é manifestada como consequência, podendo refletir ao que possivelmente ocorreria com os humanos. Porém, são poucos os estudos sobre este tema que abordem os peixes como organismos modelos e bioindicadores. Desta forma, neste projeto o objetivo é padronizar um teste de mensuração de comprimento dos telômeros em peixes frente ao estresse pela exposição a poluentes.

Os poluentes utilizados foram o herbicida 2,4-D (ácido 2 4-diclorofenoxiacético) e o efluente têxtil (tratado e não tratado). O 2,4-D é um dos herbicidas mais utilizados na agricultura mundial para controle de pragas, assim como em áreas urbanas (ZUANAZZI; GHISI; OLIVEIRA, 2020). Este herbicida se acumula progressivamente no ambiente, atingindo o solo, ar e a água (LI, K. *et al.*, 2017). Por esta característica se torna uma ameaça para a saúde dos organismos em todos os níveis tróficos. Da mesma forma, o efluente têxtil pode conter diversas substâncias com potencial contaminante, como metais pesados e corantes (HEMACHANDRA; PATHIRATNE, 2016). O descarte inadequado dos efluentes no ambiente aquático leva ao desequilíbrio ecológico, devido a presença dos corantes na água, que acabam impedindo a efetividade da atividade fotossintética, vindo ocasionar a toxicidade na fauna e flora aquática (LALNUNHLIMI; VEENAGAYATHRI, 2016).

À vista disso, foi realizado o bioensaio com peixes juvenis e alevinos de *Rhamdia quelen*, com o objetivo deste trabalho foi testar primers diferentes para amplificar a amostra de DNA de peixes da espécie *R. quelen*, inicialmente por PCR convencional e após estabelecido por PCR – RT, para padronizar um teste de mensuração de comprimento dos telômeros em peixes frente ao estresse pela exposição a poluentes.

2 PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS DA PESQUISA

Os bioensaios foram realizados na UNEPE – Piscicultura, laboratórios de reprodução animal e biologia molecular nas dependências da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - campus Dois Vizinhos. Para a mensuração dos telômeros, utilizamos como bioindicador a espécie de peixe *Rhamdia quelen*, conhecido popularmente como jundiá. Todos os animais foram adquiridos em piscicultura comercial e após chegarem nas dependências da universidade foram aclimatados no setor da piscicultura da UTFPR- Dois Vizinhos com aeração e temperatura (28°C) controladas, por período mínimo de 5 dias e alimentados 2 vezes ao dia com ração 16% PB com fornecimento controlado de 1,5% da biomassa.

Os projetos para os experimentos foram previamente submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (CEUA-UTFPR), desta forma

a exposição dos animais ocorreu com dois poluentes, sendo o herbicida 2,4-D (2,4-Diclorofenoxiacético) e efluente têxtil (tratado e não tratado). O bioensaio e coletas com o herbicida foi realizado em 2019, já com o efluente têxtil foi em 2020. O efluente têxtil usado para os testes foi cedido por uma indústria de jeans, localizada do sudoeste do Paraná.

O efluente têxtil coletado na indústria foi tanto o efluente bruto, quanto o efluente tratado. Para o bioensaio, os peixes foram distribuídos em número de 10 indivíduos em caixas de polietileno de 60 litros (Figura 1), contendo 6 tratamentos baseados em diluições do efluente a constar: 10%, 7,5%, 5,0%, 2,5%, 1,25% e 0%. A exposição ao efluente teve duração de 7 dias e foi realizado em triplicata, tendo ao todo 360 animais, onde 180 foram submetidos ao efluente bruto e 180 para o efluente tratado, a concentração dos tratamentos para ambos foram iguais.

Figura 1. Desenho amostral do experimento com *Rhamdia quelen* sob exposição de efluentes têxteis



Fonte: Autoria própria

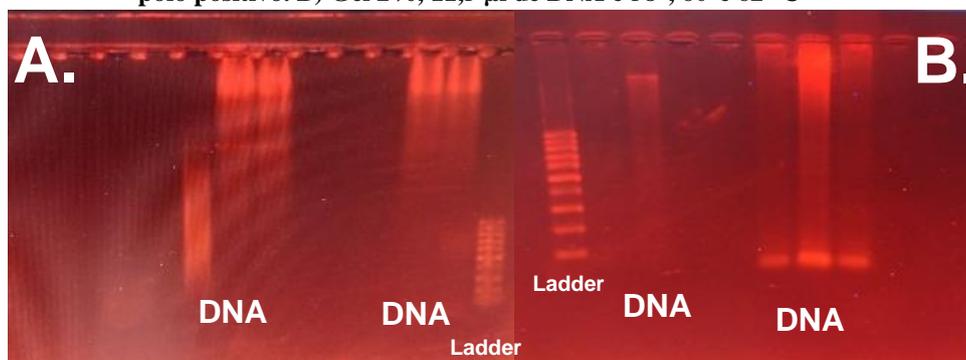
A exposição ocorreu de acordo com o método semi-estático, no qual a cada 24 horas a solução recebia troca de 30% de seu volume total, contendo a concentração inicial da substância teste. Os animais foram alimentados diariamente com a oferta de cerca de 5% da massa corporal média dos indivíduos. Posteriormente ao término da exposição, os peixes foram anestesiados com cloridrato de benzocaína (100mg/L) segundo as Diretrizes da Prática de Eutanásia estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) corroborada pela Resolução normativa n° 44 de 2019, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal: Peixes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica – II. Desta forma, foi possível realizar a coleta do músculo de 140 animais, as amostras foram acondicionadas em etanol e armazenadas em nitrogênio líquido até o início do processamento de análises.

Posteriormente, iniciou-se o processo de extração de DNA. Para realizar a extração, as amostras eram descongeladas e maceradas, então o DNA foi extraído com kit de extração de DNA integral (Wizard Promega®). O DNA extraído era quantificado e mensurado quanto sua integridade em quantificador Qubit 4.0. Atualmente, estão sendo realizadas tentativas para a prospecção de padronização da amplificação em PCR – RT, mas considerando o alto custo deste tipo de análise molecular, a padronização da amplificação está sendo realizada primeiramente com a técnica de PCR convencional. Desta forma, até que a amplificação ocorra com sucesso, os testes de amplificação estão sendo realizados com primers de espécies já estudadas para mensuração de telômeros. Os primers serão desenhados para alguma espécie próxima que tenha seu DNA genômico descrito, sendo uma etapa de prospecção pelos iniciadores que seja bem sucedido na amplificação do DNA dos telômeros de *Rhamdia quelen*.

3 RESULTADOS

Os resultados obtidos para a extração do DNA foram bastante satisfatórios, mostrando que a forma adotada para realizar esta prática foi apropriada. Isto é possível afirmar pela eletroforese realizada com o material extraído, onde foram utilizadas diferentes concentrações de gel de agarose para a eletroforese (1% e 2%). A temperatura durante a PCR também foi analisada em graus diferentes, sendo 58°, 60°, 62°C e 67,6°, 69,7°C. A concentração de DNA variou em 1 microlitro e 11,5 microlitros para as análises de PCR. O resultado das variáveis adotadas durante esta etapa do protocolo se mostrou eficaz através da eletroforese com gel de agarose. Na figura 2 abaixo, temos o resultado que avalia concentrações distintas do gel de agarose.

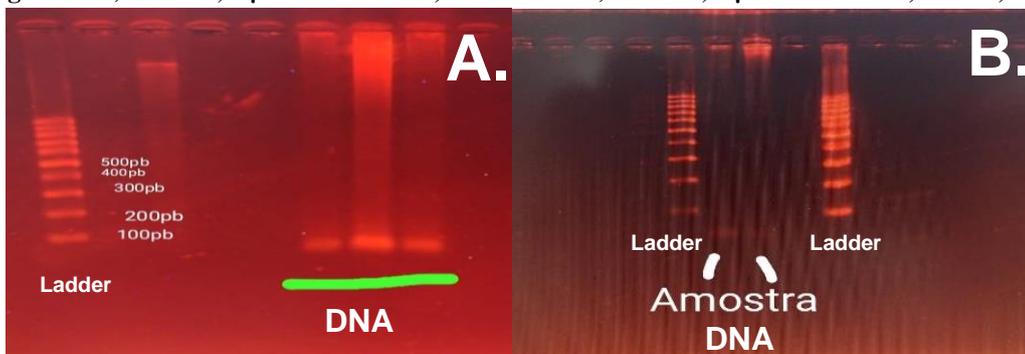
Figura 2. A) Gel 1%, 11,5 µl de DNA e 58°, 60° e 62° C, mostrando a migração das moléculas de DNA para o polo positivo. B) Gel 2%, 11,5 µl de DNA e 58°, 60° e 62° C



Fonte: Douglas Fernando Zimmer

Podemos notar na figura acima (A) o resultado da PCR em eletroforese com gel 1% os fragmentos do material genético tiveram maior degradação durante a migração para o polo negativo. Já na figura (B) com a maior concentração do gel, houve menor degradação, desta forma as bandas ficaram mais visíveis apresentando aproximadamente 100 pares de bases (pb). Com este parâmetro da concentração do gel de agarose definido, as próximas variáveis avaliadas foram a concentração da amostra de DNA e a temperatura, como apresentado na figura 4.

Figura 3. A) Gel 2%, 1 µl de DNA e 58°, 60° e 62° C. B) Gel 2%, 1 µl de DNA e 67,6° e 69,7° C



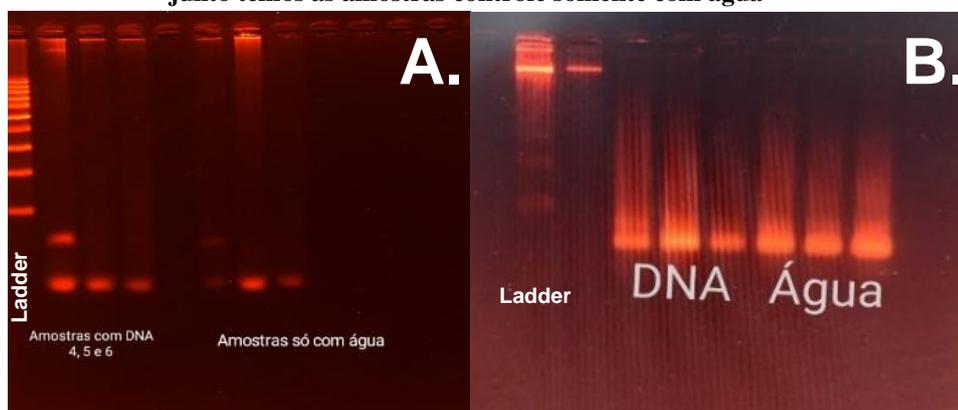
Fonte: Douglas Fernando Zimmer



Com base na figura 3, podemos perceber que a figura (A) apresenta o gel em que foi aplicada uma menor temperatura ao comparar com a (B), assim a visualização da banda das amostras ficou mais evidente na (A), com aproximadamente 100 bp. Desta forma, com relação a extração do DNA, podemos afirmar com base na eletroforese em gel de agarose sua eficiência. Portanto, foi possível padronizar a concentração do gel e a temperatura, com relação a concentração da amostra, em ambas as análises elas apresentaram boa visualização, indicando que tanto uma quanto a outra pode ser utilizada neste protocolo.

A próxima etapa do projeto é a prospecção de padronização da amplificação em PCR – RT com primers utilizados em espécies já estudadas. Desta maneira, temos os resultados das tentativas de amplificação com a PCR convencional, testando diferentes primers e temperaturas (Figura 4).

Figura 4. A) Resultado da PCR em temperaturas de 51°, 53° e 55°C, da esquerda para a direita com o primer beta actina 2. B) Resultado da PCR com os primers tel 1 e tel 2 nas temperaturas de 64°, 66° e 68°C, junto temos as amostras controle somente com água



Fonte: Douglas Fernando Zimmer

Como apresentado na figura acima, a amplificação por PCR convencional nos pré-testes não obteve êxito. Ao comparar o peso molecular dos pares de bases das amostras com o controle, podemos notar que não houve amplificação com nenhum dos primers/temperatura avaliados. Deste modo, novas tentativas serão realizadas e se caso não forem promissoras, a amplificação será desenvolvida com métodos de bioinformática.

4 CONCLUSÃO

A extração do DNA de jundiás através do músculo foi realizada com sucesso, sendo o protocolo já estabelecido com base nas análises realizadas. Atualmente, neste projeto há muito trabalho para a prospecção da padronização da amplificação por PCR em tempo real, essa etapa que não foi concluída e continua em desenvolvimento. Portanto, a amplificação do material genético de uma espécie que não possui primers desenhados é complicada, pois é necessário passar por um período longo de tentativas e erros até obter os resultados desejados para instituir um protocolo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pel, a UTFPR campus Dois Vizinhos, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e a Fundação Araucária.



REFERÊNCIAS

- GARDNER, M. *et al.* Gender and telomere length: Systematic review and meta-analysis ☆. **Experimental Gerontology**, v. 51, p. 15–27, 2014.
- HEMACHANDRA, C. K.; PATHIRATNE, A. Combination of physico-chemical analysis, *Allium cepa* test system and *Oreochromis niloticus* erythrocyte based comet assay/nuclear abnormalities tests for cyto-genotoxicity assessments of treated effluents discharged from textile industries. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 131, p. 54–64, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.05.010>
- HIGA, M.; FUJITA, M.; YOSHIDA, K. DNA replication origins and fork progression at mammalian telomeres. **Genes**, v. 8, n. 4, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/genes8040112>
- LALNUNHLIMI, S.; VEENAGAYATHRI, K. Decolorization of azo dyes (Direct Blue 151 and Direct Red 31) by moderately alkaliphilic bacterial consortium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 39–46, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.013>
- LI, J. S. Z; DENCHI, E. L. How stem cells keep telomeres in check. **Differentiation**, v. 100, n. January, p. 21–25, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.diff.2018.01.004>
- LI, K. *et al.* Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. **Chemosphere**, v. 171, p. 40–48, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.032>
- NUSSEY, D. H. *et al.* Measuring telomere length and telomere dynamics in evolutionary biology and ecology. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 4, p. 299–310, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12161>
- SOBINOFF, A. P.; PICKETT, H. A. Alternative Lengthening of Telomeres: DNA Repair Pathways Converge. **Trends in Genetics**, v. 33, n. 12, p. 921–932, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.09.003>
- VALUCHOVA, S. *et al.* Protection of arabidopsis blunt-ended telomeres is mediated by a physical association with the ku heterodimer. **Plant Cell**, v. 29, n. 6, p. 1533–1545, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00064>
- ZUANAZZI, N. R.; GHISI, N. C.; OLIVEIRA, E. C. Analysis of global trends and gaps for studies about 2,4-D herbicide toxicity: A scientometric review. **Chemosphere**, v. 241, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125016>