



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um mundo em transformação

Elaboração de biomarcador molecular para medição de telômeros expostos à poluente

DEVELOPMENT OF MOLECULAR BIOMARKER FOR MEASUREMENT OF TELOMERES EXPOSED TO THE POLLUTANT

Douglas Fernando Zimmer*, Camila Luiza Comelli[†],

Marina Wust Vasconcelos[‡], Ana Paula da Silva[§], Nédia de Castilhos Ghisi[¶], Flávia Regina
Oliveira de Barros[‡]

RESUMO

O presente trabalho se insere no contexto da grande geração e descarte incorreto de poluentes no meio ambiente. Uma vez exposto, a fauna presente pode apresentar danos severos e irreversíveis em aspectos moleculares. Neste contexto, os peixes podem se revelar um bom bioindicador para poluição ambiental. Com o intuito de criar um protocolo padronizado para mensuração de telômeros e verificar o grau de dano na região telomérica do cromossomo provocado por dois poluentes (efluente têxtil e o herbicida ácido diclorofenoxiacético) em peixes da espécie *Rhamdia quelen*, foi realizado um ensaio onde ocorreu exposição de doses sub-letais de ambos os poluentes de forma separada. Através da técnica de qPCR, a amplificação do DNA pode ser acompanhada em tempo real, além de possuir uma maior precisão e confiabilidade de resultados. Resultados preliminares da pesquisa se mostram favoráveis e perspicazes na padronização da técnica em *Rhamdia quelen*. A pesquisa caminha com resultados parciais promissores, que, finalizados, poderão ser de extrema importância para pesquisas futuras de análise e mensuração de telômeros frente a poluentes e estresse, a padronização da técnica em peixes da ordem siluriforme, viabiliza pesquisas em territórios de clima tropical (caso do Brasil), além de se utilizar peixes comuns na região.

Palavras-chave: Telômero, Xenobióticos, qPCR, Genotoxicidade, Bioindicadores

ABSTRACT

The present study is inserted in the context of the great generation and incorrect disposal of pollutants in the environment. Once exposed, the fauna present can present severe and irreversible damage in molecular aspects. In this context, fish can prove to be a good bioindicator for environmental pollution. In order to create a standardized protocol for measuring telomeres and verifying the degree of damage in the telomeric region of the chromosome caused by two pollutants (textile effluent and the herbicide dichlorophenoxyacetic acid) in fish of the species *Rhamdia quelen*, a test was carried out where exposure occurred of sub-lethal doses of both pollutants separately. Through the qPCR technique, DNA amplification can be monitored in real time, in addition to having greater precision and reliability of results. Preliminary research results are favorable and insightful in standardizing the technique in *Rhamdia quelen*. The research is progressing with promising partial results, which, when completed, may be extremely important for future research on the analysis and measurement of telomeres against pollutants and stress, the standardization of the technique in fish of the siluriform order, enables research in tropical climate territories (the case of Brazil), in addition to using fish common in the region.

Keywords: Telomer, Xenobiotics, qPCR, Genotoxicity, Bioindicators

* Ciências Biológicas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil;
zimmer.2017@alunos.utfpr.edu.br

[†] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; milacomelli@gmail.com

[‡] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; marinawust@gmail.com

[§] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; anna-p-17@hotmail.com

[¶] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos (Dois Vizinhos); nediaghisi@gmail.com

[‡] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos (Dois Vizinhos); flaviarob@gmail.com



1. INTRODUÇÃO

As resoluções normativas para utilização de animais em pesquisas passaram por revisões constantes nas últimas décadas. Há uma tendência da substituição gradual de animais de experimentação mais complexos (mamíferos de forma geral) por animais mais simples, como peixes, seguindo a determinação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), que visa estabelecer a diretriz dos 3Rs: do inglês *Replace* (Substituição), *Reduce* (Redução) e *Refine* (Refinamento) (CONCEA, 2017).

Os telômeros, do grego ‘*Telos*’ (extremidade) e ‘*Meros*’ (final), são estruturas presentes na região terminal dos cromossomos (Snustad e Simmons, 2020). São estruturas presentes nas extremidades dos cromossomos de todos os eucariotos, inclusive nos vertebrados, e são 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 perda de regiões de genes codificantes a cada divisão celular (SIMIDE Et al., 2016).

Uma vez padronizado, este método será utilizado para avaliar os efeitos de dois poluentes, o Ácido Diclorofenoxiacético (2,4-D) e de efluentes têxteis sobre os telômeros de um organismo bioindicador, o jundiá (*Rhamdia quelen*), o qual possui uma ampla importância econômica e ecológica na América do Sul (Mela et al., 2013), além de possuir ampla utilização em ensaios toxicológicos (KLINGELFUS Et al., 2015; MELA Et al., 2013; MOURA COSTA Et al., 2016).

O 2,4-D é um herbicida utilizado principalmente no controle de plantas daninhas (Jervais et al., 2009). O 2,4-D já foi relacionado a problemas como câncer (IARC, 2018). Os efluentes têxteis compreendem os resíduos gerados pela indústria têxtil, a qual possui uma importância notável, sendo o Brasil a maior cadeia têxtil completa do ocidente, gerando 16,7% dos empregos na indústria de transformação no país (ABIT, 2016). Portanto o desenvolvimento de um protocolo padronizado para a mensuração dos telômeros em peixes Neotropicais é de grande importância para a comunidade científica em geral para a avaliação dos impactos de poluentes sobre essa região tão importante de nosso DNA.

Tendo em vista o baixo número de trabalhos com peixes de clima tropical como bioindicadores, e nenhum realizando a mensuração de telômeros, e a crescente demanda por respostas mais localizadas, se faz necessário a adoção de novos protocolos padronizados para tais animais. Por este motivo, este projeto tem por objetivo a padronização para mensuração do comprimento de telômeros em peixes Neotropicais.

2. METODOLOGIA

2.1. Bioensaios

Os exemplares juvenis de *Rhamdia quelen* (Siluriforme) foram divididos em dois grupos: O primeiro para exposição ao herbicida 2,4-D e o segundo grupo exposto à efluente têxtil.

2.1.1. Bioensaio com 2,4-D

O primeiro grupo contou com indivíduos no estágio larval expostos ao herbicida 2,4-D, o bioensaio foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal da UTFPR-DV (Figura 1), sendo um ensaio semi-estático, com troca de metade do volume das soluções a cada 24 horas. As concentrações delimitadas foram de 0, 15, 30 e 60 µg/L do princípio ativo, baseando-se no limite estabelecido pela Organização Mundial da Saúde para



a água potável, que é de 30 µg/L (WHO, 2003). Os indivíduos foram dispostos em microplacas de 24 poços com volume de 1 ml. As microplacas permaneciam em uma temperatura constante de 24°C. Ao término da exposição de 168 horas, três indivíduos de cada concentração foram coletados e armazenados no congelador para a posterior análise.

Figura 1 - Bioensaio com 2,4-D



Fonte: Nédia Ghisi (2020)

2.1.2 Bioensaio com efluente têxtil

No segundo grupo, exposto à efluente têxtil, os indivíduos foram aclimatados por um período de 20 dias na Piscicultura de UTFPR-DV (Figura 2) e então introduzidos em dois bioensaios, um contendo efluente têxtil bruto e outro possuindo efluente têxtil tratado. Nestas exposições os peixes foram submetidos a doses subletais de 1,25; 2,5; 5; 7,5 e 10% de efluente respectivamente, conforme protocolo descrito pela NBR-15088 (ABNT, 2016). O ensaio semi-estático contou com renovação de 12,5% da solução a cada 24 horas. Após 168 horas de exposição foi coletada amostras de músculo de 140 peixes (70 peixes expostos à efluente têxtil bruto e 70 peixes expostos à efluente têxtil tratado) e estocadas em nitrogênio líquido até o processamento.

Figura 2 - Bioensaio com efluente têxtil



Fonte: Marina Wust (2020)

2.2 Extração de DNA



Posteriormente, com as amostras já descongeladas, tem início a fase de extração de DNA. Para esta etapa é utilizado o protocolo de extração do kit Wizard Promega®. O kit é baseado em um processo de quatro etapas. A primeira envolve na lise das membranas celulares e nuclear, seguida de uma etapa de digestão de RNA, em seguida ocorre a precipitação e remoção de proteínas e por fim a precipitação e concentração do DNA genômico (PROMEGA, 2009). O material extraído é verificado quanto a sua qualidade e integridade através da técnica de eletroforese em gel.

2.3 Mensuração dos telômeros por PCR convencional

A técnica de qPCR é mais cara e sensível que a PCR convencional, portanto, a fim de otimizar recursos como reagents, primers e tubos¹. Portanto, para esta etapa de prospecção de amplificação por PCR foi realizada uma revisão na literature para se determinar os primers mais aptos para esta espécie, neste contexto, os primers utilizados e que apresentaram melhor eficiência foram: Tella – 5' GCACTCACACCTCCATAAC 3' e Tel1b – 5' ACAGCCTACGACAGAGACTAA 3'. O gene endógeno utilizado foi SalGAP8-F – 5' GTAAGACAGGATTGAGGCATCTC 3' e SalGAP8-R – 5' CCGAATCCATTGACACCTACTT 3'. O aparelho de termociclador foi configurado em 94° C por 3 minutos, 94° C durante 30 segundos, 53° C por 30 segundos, 72° C por 1 minuto, 72° C durante 10 minutos, tudo isso repetido em 35 ciclos.

2.4 Mensuração dos telômeros por qPCR

No atual momento, está sendo realizado os primeiros testes no termociclador de qPCR, utilizando-se dos mesmos parâmetros estabelecidos previamente na mensuração por PCR convencional. A técnica de qPCR permite ao pesquisado acompanhar e verificar os resultados de seu procedimento durante a realização da amplificação do material, portanto, os resultados obtidos são analisados logo em seguida ao término do procedimento, no próprio aparelho. Para o primeiro teste foi utilizado 20 peixes provenientes do bioensaio envolvendo o efluente textil, foi selecionado 5 peixes do grupo controle do efluente textile bruto, 5 peixes da concentração 10% do efluente bruto, 5 peixes do grupo controle do efluente tratado e 5 peixes da concentração 10% do efluente tratado.

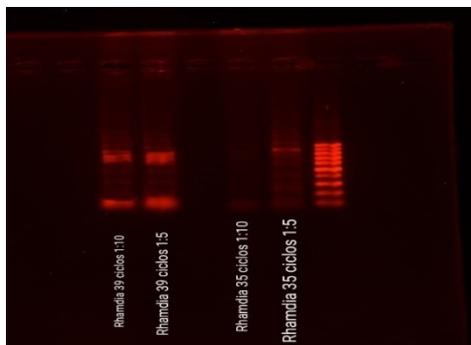
3. RESULTADOS

Na busca de um protocolo padronizado, várias variáveis foram consideradas e testadas, como por exemplo, primers, temperatura de anelamento de PCR e diluição de DNA. Após diversas tentativas as condições ideais para a amplificação do material genético foi realizada com os primers Tella – 5' GCACTCACACCTCCATAAC 3' e Tel1b – 5' ACAGCCTACGACAGAGACTAA 3' (Figura 3). O DNA extraído passou por uma diluição 1:4 com água ultrapura e as configurações do termociclador foram 94° C por 3 minutos, 94° C durante 30 segundos, 53° C por 30 segundos, 72° C por 1 minuto, 72° C durante 10 minutos, tudo isso repetido em 35 ciclos.

¹ Como esta etapa trata-se apenas de um teste a fim de se encontrar parâmetros mais próximos para a realização da qPCR os peixes utilizados também não se tratam de nenhum bioensaio citado anteriormente, trata-se de uma doação da piscicultura da UTFPR-DV para a realização dos testes.



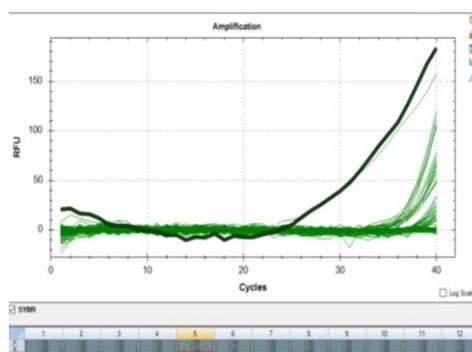
Figura 2 - Resultado de PCR



Fonte: Autoria própria (2021)

A figura 2 mostra a amplificação do DNA pela PCR convencional entre 800 e 900 pares de base. As condições citadas anteriormente foram mantidas para a realização da técnica no termociclador de qPCR, os resultados encontrados foram demonstrados na figura 4.

Figura 3 - Resultado da qPCR



Fonte: Autoria própria (2021)

Nesta primeira verificação (figura 3) não houve uma amplificação satisfatória, pois, apenas dois poços amplificaram. Nota-se que o intervalo de unidade relativa de fluorescência se mostrou muito baixo, sendo que as curvas finais podem ser consideradas apenas ruído da PCR.

Na sequência do desenvolvimento deste projeto terá continuação as tentativas de amplificação na técnica de qPCR.

4. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados são promissores e revelam uma grande evolução quando comparada com os resultados iniciais. Os parâmetros trabalhados na qPCR serão reavaliados a fim de se encontrar uma amplificação do material genético.



O projeto irá continuar e, tendo em vista os resultados encontrados, em breve se alcançara um protocolo padronizado e eficaz para a mensuração dos telômeros.

As atividades deste projeto tiveram continuidade apesar das dificuldades encontradas em decorrência da Pandemia de COVID-19 e do alto valor dos materiais necessários.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente à CNPq por financiar este projeto, bem como a UTFPR campus Dois Vizinhos por ceder suas instalações, laboratórios e equipamentos. Gostaria de agradecer também à todas as pessoas envolvidas neste projeto, direta e indiretamente, que dedicaram sua atenção e esforços para que tudo isso fosse possível.

REFERÊNCIAS

- ABIT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDUSTRIAL TEXTIL E CONFECÇÃO. **Perfil do setor**. [S. l.], nov 2019. Disponível em: <https://www.abit.org.br/cont/perfil-dosetor>. Acesso em: 21 jul. 2020.
- ABNT NBR 15088: 2016. Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade aguda: método de ensaio com peixes
- 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. CONCEA, (CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL). RN 34. Peixes. 2017, p. 1–57.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. DDT, Lindane, and 2,4-D. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507424/>. Acesso em 27 Jul. 2020.
- JERVAIS, G et al.. Folha informativa geral de 2,4- D; Centro Nacional de Informações sobre Pesticidas, Serviços de Extensão da Universidade Estadual de Oregon. Rev. 2009. Disponível em: <http://npic.orst.edu/factsheets/24Dgen.html>. Acesso em 22 jul. 2020.
- KLINGELFUS, T. et al. DNA damage in the kidney tissue cells of the fish *Rhamdia quelen* after trophic contamination with aluminum sulfate. *Genetics and Molecular Biology*, v. 38, n. 4, p. 499–506, 2015.
- MELA, M. et al. Risks of waterborne copper exposure to a cultivated freshwater Neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 88, p. 108–116, 2013.
- MOURA COSTA, D. D. et al. Characterization, specificity and sensibility of produced anti-*Rhamdia quelen* vitellogenin in Brazilian fish species. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 42, n. 6, p. 1721– 1732, 2016.
- PROMEGA. Wizard® Genomic DNA Purification Kit. p. 21, 2009.
- 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.
- SNUSTAD, P., SIMMONS, M. J. *Fundamentos de Genética*. 7ª Edição, Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2017.
- World Health Organization. *Lead in drinking-water: background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality*. 2003.