

## GENÔMICA NO BIOMONITORAMENTO: CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DE GENES ASSOCIADOS A ECOTOXICIDADE EM PEIXES-ANUAIS

MARIANA CAVALCANTI NASCIMENTO<sup>1</sup>; ANTÔNIO DUARTE PAGANO<sup>2</sup>; LUANA FERREIRA VIANA DOS REIS<sup>2</sup>, TONY LEANDRO REZENDE DA SILVEIRA<sup>2</sup>, VINICIUS FARIAS CAMPOS<sup>2</sup>; MARIANA HÄRTER REMIÃO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [marianacbiotec@gmail.com](mailto:marianacbiotec@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [antionioduartepagano@gmail.com](mailto:antionioduartepagano@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [luanafvreis@gmail.com](mailto:luanafvreis@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande – [silveira.tr@gmail.com.br](mailto:silveira.tr@gmail.com.br)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [fariascampos@gmail.com](mailto:fariascampos@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [mariana.remiao@ufpel.edu.br](mailto:mariana.remiao@ufpel.edu.br)

### 1. INTRODUÇÃO

O biomonitoramento consiste na avaliação sistemática de respostas biológicas de organismos vivos para avaliar a integridade de um ecossistema. Os “bioindicadores” são as espécies utilizadas para monitorar a qualidade ambiental, sendo os peixes um dos principais utilizados para a avaliação de ambientes aquáticos. Já as respostas biológicas geradas em resposta à poluição são conhecidas como “biomarcadores”, e são detectadas principalmente nos fluidos corporais, células ou tecidos e identificadas ao nível molecular, celular, fisiológico e comportamental (LOPES et al., 2017).

Dentre os biomarcadores usados no biomonitoramento, destacam-se os marcadores genômicos. Respostas biológicas moleculares, como a expressão gênica, indicam efeitos ambientais precoces e são detectadas anteriormente ao aparecimento de efeitos populacionais, que comprometem a aptidão das espécies. Nesse sentido, a genômica integra a biotecnologia à ecotoxicologia, e compreende o estudo da expressão gênica associada à exposição de bioindicadores a poluentes (DE CASTILHOS GHISI et al., 2022).

As modernas tecnologias genômicas podem gerar subsídios inovadores ao biomonitoramento e à conservação da fauna ameaçada. A Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR) é a técnica padrão ouro para quantificar moléculas de RNA mensageiro (mRNA). Essa abordagem predispõe o conhecimento exato, para cada espécie, da sequência nucleotídica dos biomarcadores a serem analisados. Isso dificulta a utilização da qPCR no monitoramento de espécies de peixes selvagens e ameaçadas de extinção, onde o conhecimento da genômica desses animais é escasso.

Dentre a fauna brasileira ameaçada, os peixes-anuais compõem o grupo de peixes em maior risco de extinção (ICMBIO, 2018). Peixes-anuais são espécies raras e extremófilas, habitando áreas úmidas temporárias. A espécie *Austrolebias charrua* habita charcos desde o extremo sul do Brasil ao leste do Uruguai. O fator antrópico determinante para o declínio populacional da espécie é a agricultura extensiva, uma vez que *A. charrua* habita áreas alagadas adjacentes a

monoculturas onde pesticidas são utilizados intensivamente, especialmente os herbicidas a base de glifosato (VOLCAN et al., 2018).

Um dos principais efeitos da exposição de animais a pesticidas é o estresse oxidativo, uma condição biológica causada pelo desequilíbrio entre a produção de radicais livres, as espécies reativas de oxigênio (EROs), e a capacidade do organismo de detoxificar essas moléculas pró-oxidantes (OROPESA et al., 2008). Por exemplo, as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) são a primeira e segunda linha de defesa antioxidante, respectivamente. A isoforma SOD2, localizada estrategicamente na matriz mitocondrial, o principal sítio de formação de EROs, catalisa a dismutação do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Após, os radicais peróxido são decompostos em água ( $H_2O$ ) e oxigênio ( $O_2$ ) pela enzima CAT (ZAIDI et al., 2021). Ainda, a acetilcolinesterase (AChE) é uma hidrolase que atua na condução de impulsos nervosos pela quebra do neurotransmissor acetilcolina (ACh) na fenda sináptica. A AChE é utilizada largamente em programas de monitoramento ambiental a fim de acessar a presença de químicos na água, especialmente os pesticidas (NANDI et al., 2019).

Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi realizar a clonagem de 3 genes relacionados ao estresse encontrados em peixes-anaís da espécie *A. charrua*, sendo eles os genes que codificam para a acetilcolinesterase (*ache*), a catalase (*cat*) e superóxido dismutase 2 (*sod2*).

## 2. METODOLOGIA

### 1. Coleta dos animais

Em campos costeiros perto da orla da praia do Cassino, no município de Rio Grande (32°2'6"S, 52°5'56"O), foram capturados, em poças temporárias, cinco peixes em estágio adulto da espécie *Austrolebias charrua*, usando puçás com malha de 4 mm. Todas as práticas de manejo animal e coleta foram devidamente aprovadas pelos comitês de ética em experimentação animal (CEUA UFPEL 145/2019 e CEUA FURG P053/2019), e autorização do IBAMA/SISBIO 71072. Posteriormente, os exemplares foram transferidos para tanques contendo a água local e transportados até o Biotério Aquático da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), onde permaneceram por um período de 3 semanas, seguindo as condições de criação previamente estabelecidas (VOLCAN et al., 2013).

### 2. Coleta dos tecidos, extração de RNA e síntese de cDNA

Para efetuar a eutanásia, os animais foram submetidos a um choque térmico drástico, seguido de decapitação. Em seguida, coletaram-se amostras dos tecidos cerebrais, que foram acondicionados em criotubos e imediatamente armazenados em nitrogênio líquido. O RNA dessas amostras foi extraído, fazendo uso do kit PureLink™ RNA Mini Kit. Após, utilizando o espectrofotômetro NanoVue™ Plus, o RNA foi quantificado e sua pureza avaliada por meio da relação A260/A280. Por fim, foi realizada através da aplicação do kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription, a síntese da cadeia complementar de DNA (cDNA).

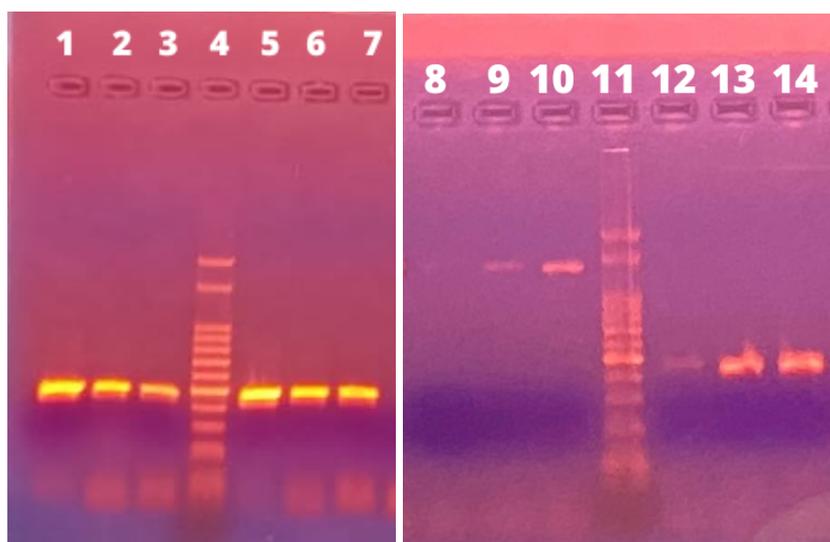
### 3. Clonagem molecular da *ache*, *cat* e *sod2*

Para realizar a clonagem molecular dos genes candidatos, utilizou-se a ferramenta online PriFi para elaborar os primers. Posteriormente utilizou-se o GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase como mix de amplificação nas reações de PCR, onde os primers e o cDNA previamente produzido foram adicionados. A amplificação dos fragmentos gênicos foi realizada em um termociclador SimpliAmp™ em gradiente de temperatura que variou de 60,6°C a 64,5°C. A validação foi feita por eletroforese em gel de agarose. A etapa subsequente envolveu a purificação dos produtos das reações de PCR, a qual foi conduzida utilizando o sistema de gel eletrônico E-Gel™ EX Agarose Gels.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando a ameaça de extinção enfrentada pelos peixes-anuais, é de extrema importância analisar todas as informações referentes à genômica estrutural dessas espécies. Desta forma, este estudo busca elucidar aspectos relacionados à genômica estrutural e funcional da espécie *A. charrua*, estimulando o estudo da genômica aplicada ao monitoramento ambiental.

Como resultados da extração de RNA, as amostras de cérebro tiveram média de concentração de 78,9 e pureza de 1,97, o que se mostra satisfatório para a continuidade das análises. Prosseguindo para as reações de PCR, verificou-se em gel de agarose que os primers de *ache* amplificaram melhor na temperatura de 62,5°C, os de *cat* em 60,5°C e os de *sod2* em 62,5°C. Os fragmentos gerados tiveram tamanhos correspondentes aos esperados que são de 468 pb para *ache*, 1319 pb para *cat* e 440 pb para *sod2*. Tais resultados podem ser observados na Figura 1.



**Figura 1.** Gel de agarose para verificação da reação de PCR utilizando amostra de cérebro para amplificação dos fragmentos de cDNA, de acordo com os primers correspondentes. 1: *ache*, concentrado, 62.5°; 2: *ache*, 10x, 62.5°; 3: *ache*, 100x, 62.5°; 4: Marcador; 5: *ache*, concentrado, 64.5°; 6: *ache*, 10x, 64.5°; 7: *ache*, 100x, 64.5°; 8: *cat*, concentrado, 64.5; 9: *cat*, concentrado, 62.5; 10: *cat*, concentrado, 60.5; 11: Marcador; 12: *sod2*, concentrado, 64.5; 13: *sod2*, concentrado, 62.5°; 14: *sod2*, concentrado, 60.5°C..

## 4. CONCLUSÕES

O estudo apresentado avança no conhecimento da genômica das espécies de peixes-anaís ameaçadas de extinção no Brasil. Conhecer os genes *ache*, *cat* e *sod2* de *A. charrua* se faz importante já que estes são utilizados como biomarcadores em ecotoxicologia, abrindo novas perspectivas para o desenvolvimento de tecnologias de biomonitoramento e avaliação ecotoxicológica de peixes-anaís. Além disso, este estudo torna-se um catalisador para a inovação no desenvolvimento de ferramentas moleculares destinadas ao monitoramento ambiental dessas espécies, com um foco particular na investigação dos efeitos de poluentes ambientais, como pesticidas, sobre a expressão gênica, tendo *A. charrua* como um indicador confiável de poluição ambiental. Em etapas posteriores será realizado o sequenciamento e testada a estabilidade desses genes, propostos como potenciais biomarcadores em peixes-anaís, consolidando, assim, o progresso da pesquisa ecotoxicológica e fortalecendo nossos esforços na conservação dessas espécies.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

de Castilhos Ghisi, N., Larentis, C., de Oliveira, E.C. et al. Environmental assessment of Neotropical streams using fish as bioindicators: a multibiomarker and integrated approach. *Hydrobiologia* 849, 4587–4604 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04460-2>

Nandi A, Yan LJ, Jana CK, Das N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 Nov 11;2019:9613090. doi: 10.1155/2019/9613090. PMID: 31827713; PMCID: PMC6885225.

Syed Kashif Zaidi, Wen-Jun Shen, Yuan Cortez, Stefanie Bittner, Alex Bittner, Sara Arshad, Ting-Ting Huang, Fredric B. Kraemer, Salman Azhar, SOD2 deficiency-induced oxidative stress attenuates steroidogenesis in mouse ovarian granulosa cells, *Molecular and Cellular Endocrinology*, Volume 519, 2021, 110888, ISSN 0303-7207, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110888>.

ICMBIO, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (2018). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume I / 1. ed. Brasília, DF. ICMBio/MMA.

Dalzochio, T., Rodrigues, G.Z.P., Petry, I.E. et al. The use of biomarkers to assess the health of aquatic ecosystems in Brazil: a review. *Int Aquat Res* 8, 283–298 (2016). <https://doi.org/10.1007/s40071-016-0147-9>

Oropesa, A. L., García Cambero, J. P., & Soler, F. (2008). Effect of long-term exposure to simazine on brain and muscle acetylcholinesterase activity of common carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental toxicology*, 23(3), 285–293. <https://doi.org/10.1002/tox.20342>

VOLCAN, M.V., Lanés, L.E.K., Brazilian killifishes risk extinction. *Science*. 361(6400), 340–341, 2018.

Ron van der Oost, Jonny Beyer, Nico P.E Vermeulen, Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Volume 13, Issue 2, 2003, Pages 57-149, ISSN 1382-6689, [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6).