

ECOTOXICOGENÔMICA APLICADA AO BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL DE PEIXES-ANUAIS

ANTÔNIO DUARTE PAGANO¹; TONY LEANDRO REZENDE DA SILVEIRA²;
MARIANA HÄRTER REMIÃO³; VINICIUS FARIAS CAMPOS⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – antonioduartepagano@gmail.com

²Universidade Federal do Rio Grande – silveira.tlr@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – mariana.remiao@ufpel.edu.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O biomonitoramento consiste no uso sistemático de respostas biológicas de organismos vivos para avaliar as mudanças ocorridas em um ecossistema. Os peixes são os principais bioindicadores utilizados na avaliação da ecotoxicidade de poluentes (YATES et al. 2021). A ecotoxicogenômica integra a genômica à ecotoxicologia, e compreende o estudo da expressão gênica associada a exposição de bioindicadores a poluição (VEILLEUX et al. 2021). Dentre os marcadores genômicos usados para monitorar a qualidade da água, destacam-se os microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs não codificantes que regulam a expressão gênica no nível pós transcricional. A técnica *Small RNA-Sequencing* (sRNA-Seq) é usada para catalogar todas as espécies de miRNAs de um organismo e quantificar a mudança dos níveis de expressão de cada miRNA (HARRILL et al. 2016). Essa metodologia tem sido usada em ecotoxicologia para identificar marcadores epigenômicos associados a exposição a poluentes. Por exemplo, a expressão de miRNAs mostrou-se alterada em peixes expostos a fármacos (CHEN et al. 2021), metais pesados (JANTAWONGSRI et al. 2022), plásticos (LIU et al. 2020) e herbicidas (ZHANG et al. 2019).

Os peixes-anuais são especialistas de habitat, e são considerados os organismos mais extremófilos dentre os vertebrados. No Brasil, eles compõem o grupo de peixes continentais em maior risco de extinção. Esses animais habitam ambientes extremos e possuem características biológicas peculiares (POLACIK; PODRABSKY, 2015). A espécie *Austrolebias charrua* habita áreas úmidas temporárias endemicamente desde o extremo sul do Brasil ao leste do Uruguai. O principal fator antrópico que ameaça essa 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 como o Roundup® (VOLCAN; LANÉS, 2018). É sabido que o glifosato e suas formulações impactam a reprodução de peixes de diferentes formas, dentre estas, a diminuição da fertilidade; a inibição da atividade de enzimas esteroideogênicas; a diminuição da qualidade espermática; alterações morfológicas das gônadas de machos e fêmeas, e aumento do estresse oxidativo (YANG et al. 2021). Em um contexto ambiental, alterações reprodutivas tornam-se preocupantes, pois diminuem a aptidão das espécies, induzindo ao declínio populacional ou até mesmo à extinção.

Dessa forma, através da técnica de sRNA-Seq, o presente trabalho objetivou identificar em larga escala miRNAs biomarcadores da reprotoxicidade associada a exposição ao Roundup® em *A. charrua* capazes de serem utilizados como uma biotecnologia de biomonitoramento ambiental de peixes-anuais.

2. METODOLOGIA

Um total de 24 indivíduos (12 machos/ 12 fêmeas) foram coletados (IBAMA/ICMBio licença Nº 71072-4) em uma poça temporária nos campos costeiros próximos ao distrito de Santa Isabel do Sul (Arroio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil). Em laboratório, os animais foram divididos em casais (1 macho/ 1 fêmea) ao longo de dois grupos experimentais: o grupo controle; e o grupo exposto ao herbicida Roundup (5 mg. L⁻¹ por 96 h). As gônadas dos peixes foram coletadas após a exposição aguda ao herbicida, seguido de extração de RNA, preparação das bibliotecas e sequenciamento de miRNAs. Por fim, foi realizada a montagem e anotação do transcriptoma, seguido das análises *in silico* de expressão diferencial e de biologia interativa. O uso animal e todas práticas de manejo foram aprovadas pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA/UFPEL 145/2019).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Peixes-anuais são espécies raras, ameaçadas de extinção e altamente especializadas a vida em ambientes efêmeros. Em vista de os habitats naturais estarem sendo invadidos por monoculturas dependentes do uso de Roundup®, no Rio Grande do Sul, é extremamente preocupante a hipótese de que os eventos reprodutivos dos peixes-anuais já não estejam sendo tão produtivos quanto outrora. Por isso, torna-se urgente o desenvolvimento de métodos de diagnóstico ambiental, visando a conservação das espécies e a manutenção da integridade física e do ciclo hidrológico das áreas úmidas temporárias.

Nesse estudo, o uso da sRNA-Seq permitiu a caracterização de elementos funcionais do genoma de peixes-anuais, espécies não-modelo onde não há a disponibilidade de um genoma de referência. O presente trabalho, por meio de técnicas de sequenciamento de alto rendimento, estimula o desenvolvimento de novas tecnologias de biomonitoramento baseadas em miRNAs (Figura 1).

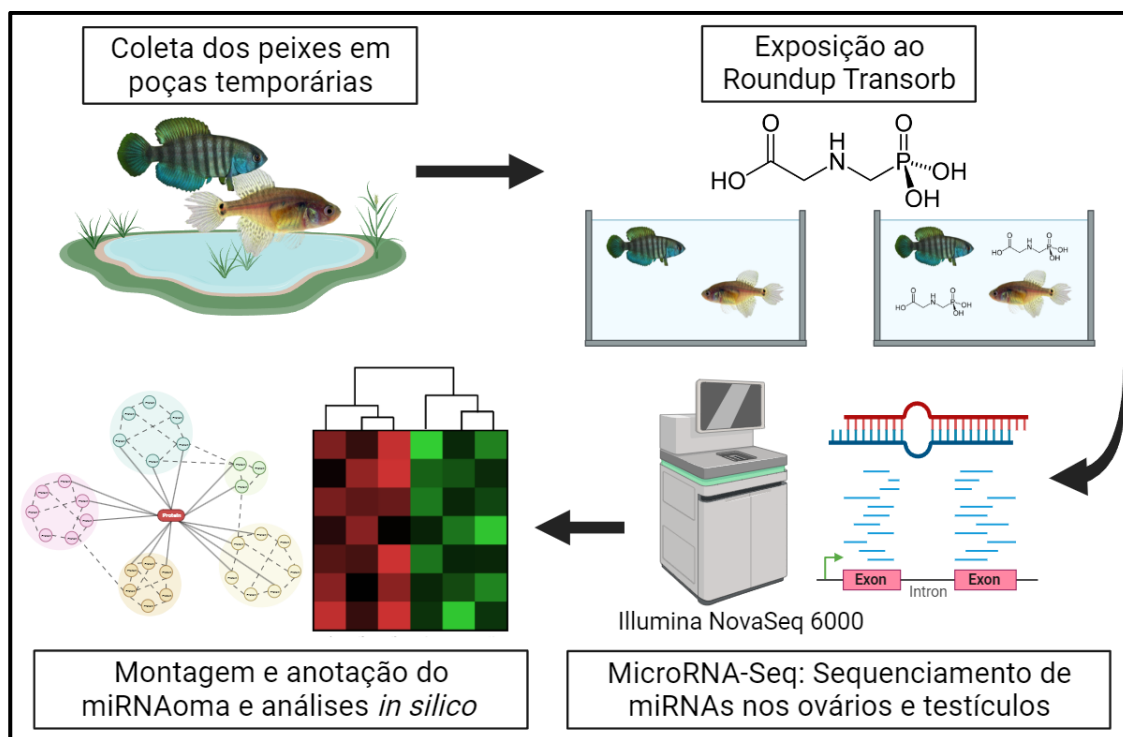


Figura 1. Representação esquemática deste trabalho.

Os miRNAs são biomarcadores sensíveis e específicos ao status de toxicidade do ambiente, e fornecem uma abordagem mais abrangente sobre os efeitos toxicológicos de poluentes sob a biota aquática. Efetivamente, por meio da análise de biomarcadores em peixes, é possível diagnosticar a qualidade da água e analisar a integridade ecológica da fauna residente, uma vez que poluentes químicos alteram a fisiologia dos organismos em diferentes níveis, como celular, bioquímico, comportamental e reprodutivo. Tendo em vista os inúmeros efeitos causados pelo herbicida Roundup® em espécies aquáticas, estudos que busquem desvendar os efeitos moleculares da exposição a esse xenobiótico tornam-se importantes e necessários.

4. CONCLUSÕES

Esse trabalho é pioneiro no sequenciamento de miRNAs em peixes-anaís expostos a um pesticida, incrementando significativamente o conhecimento sobre a (epi)genômica de uma espécie que compõe a fauna brasileira ameaçada de extinção. A prospecção do microRNAoma das gônadas de *A. charrua* permitiu a identificação de miRNAs associados a toxicidade reprodutiva do Roundup® nessa espécie. Uma vez que essas moléculas têm sido usadas inovativamente como biomarcadores em ecotoxicologia, esse estudo gera escopo para o desenvolvimento de novas biotecnologias de biomonitoramento de peixes-anaís e de avaliação ecotoxicológica mediante a quantificação de miRNAs.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

YATES, M.C., DERRY, A.M., CRISTESCU, M.E. Environmental RNA: A Revolution in Ecological Resolution? **Trends Ecol Evol.** 36(7):601-609, 2021.

YANG, C., LIM, W., SONG, G. Reproductive toxicity due to herbicide exposure in freshwater organisms. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.** 248:109103, 2021.

VEILLEUX, H.D., MISUTKA, M.D., GLOVER, C.N. Environmental DNA and environmental RNA: Current and prospective applications for biological monitoring. **Sci Total Environ.** 15;782:146891, 2021.

HARRILL, A.H., McCULLOUGH, S.D., WOOD, C.E., KAHLE, J.J., CHORLEY, B.N. MicroRNA Biomarkers of Toxicity in Biological Matrices. **Toxicol Sci.** 152(2):264-72, 2016.

ZHANG, Q., ZHENG, S., WANG, S., WANG, W., XING, H., XU, S. Chlorpyrifos induced oxidative stress to promote apoptosis and autophagy through the regulation of miR-19a-AMPK axis in common carp. **Fish Shellfish Immunol.** 93:1093-1099, 2019.

CHEN, J., LUO, Y., CAO, J., XIE, L. Fluoride exposure changed the expression of microRNAs in gills of male zebrafish (*Danio rerio*). **Aquat Toxicol.** 233:105789, 2021.

JANTAWONGSRI, K., NORREGAARD, R.D., BACH, L., DIETZ, R., SON, C., ANDERSON, K. Effects of exposure to environmentally relevant concentrations of lead (Pb) on expression of stress and immune-related genes, and microRNAs in shorthorn sculpins (*Myoxocephalus scorpius*). **Ecotoxicology**. 31(7):1068-1077, 2022.

LIU, Q., WANG, W., ZHANG, Y., CUI, Y., XU, S., LI, S. Bisphenol A regulates cytochrome P450 1B1 through miR-27b-3p and induces carp lymphocyte oxidative stress leading to apoptosis. **Fish Shellfish Immunol**. 102:489-498, 2020.

POLACIK, M., PODRABSKY, J.E. Temporary Environments. In: **Extremophile Fishes: Ecology, Evolution, and Physiology of Teleosts in Extreme Environments**. (Eds. R. Riesch, M. Tobler and M. Plath). London: Springer, pp. 217-245, 2015.

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