

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

DOUGLAS FERNANDO ZIMMER

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOMARCADOR MOLECULAR BASEADO NO
COMPRIMENTO DE TELÔMEROS EM PEIXES DA ESPÉCIE *Rhamdia quelen*
(ORDEM SILURIFORME)**

DOIS VIZINHOS

2021

DOUGLAS FERNANDO ZIMMER

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOMARCADOR MOLECULAR BASEADO NO
COMPRIMENTO DE TELÔMEROS EM PEIXES DA ESPÉCIE *Rhamdia quelen*
(ORDEM SILURIFORME)**

**Development of a molecular biomarker based on the length of telomeres in fish
of the species *Rhamdia quelen* (siluriform order)**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentada como requisito para obtenção do título de
Licenciado em Ciências Biológicas da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Nédia de Castilhos Ghisi.

Coorientador(a): Flavia Regina Oliveira de Barros.

DOIS VIZINHOS

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

DOUGLAS FERNANDO ZIMMER

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOMARCADOR MOLECULAR BASEADO NO
COMPRIMENTO DE TELÔMEROS EM PEIXES DA ESPÉCIE *Rhamdia quelen*
(ORDEM SILURIFORME)**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Licenciado em Ciências Biológicas da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 10/12/2021

Deborah Catharine de Assis Leite
Doutora
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Hilda Vanessa Poquioma Hernández Titulação
Mestra
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Hugo Felix Perini
Mestre
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

DOIS VIZINHOS

2021

Dedico este trabalho à todas as pessoas que amo e
que estiveram comigo nesta trajetória.

AGRADECIMENTOS

Sr. Isaac Newton disse certa vez: “Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro de gigantes”, tal expressão ilustra bem meus agradecimentos, se hoje estou finalizando esta etapa de minha vida, foi porque inúmeras pessoas dedicaram seu bem mais valioso em minha jornada, o tempo.

Nos ombros de meu pai (Itamir Zimmer), minha mãe (Clementina Chuta Zimmer) e minha irmã (Gabriele Zimmer) encontrei meu suporte e o carinho que apenas uma família unida pode proporcionar. Nos ombros de minha namorada (Camila Luiza Comelli) encontrei o amor e a amizade em uma única pessoa. Apesar de os nomes deles não constarem na autoria deste trabalho, saibam, nada disso seria possível sem vocês.

Ao longo dos últimos anos fiz grandes amigos, que participaram direta ou indiretamente deste trabalho, amigos que me acolheram e me aconselharam, juntos rimos e passamos raiva, mas no fim sempre demos um jeito.

Agradeço também as minhas orientadoras, Nédia de Castilhos Ghisi e Flavia Regina Oliveira de Barros pelas imensas contribuições, bem como ao Laboratório de Análises Biológicas e Biologia Molecular (BioMol) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Dois Vizinhos pelas análises realizadas, por ceder suas instalações, equipamentos e reagentes.

Por fim, agradeço a CNPq e Fundação Araucária por financiar a realização deste estudo, bem como a bolsa proporcionada pelo Edital N° 05/2020 da PROREC para APOIO A PROJETOS DESTAQUE DA UTFPR.

“...

Assim expira o mundo

Assim expira o mundo

Assim expira o mundo

Não com uma explosão, mas com um suspiro”

(T. S. Eliot, 1925).

RESUMO

Nas últimas décadas, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) visa estabelecer a diretriz dos 3Rs: do inglês *Replace* (Substituição), *Reduce* (Redução) e *Refine* (Refinamento). Neste contexto, há a necessidade de adaptar ensaios ecotoxicológicos para novos bioindicadores, sendo priorizado a adoção de peixes nas novas pesquisas. Um campo que vem ganhando destaque nos últimos anos é a mensuração de telômeros, sendo que estes são estruturas presentes nas extremidades dos cromossomos sendo constituídos de DNA não codificante 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. Nesse panorama, esta pesquisa tem por objetivo a elaboração de um protocolo padronizado de mensuração de telômeros, capaz de analisar o estresse oxidativo causado por poluentes em peixes de clima neotropical da espécie *Rhamdia quelen*, popularmente conhecido como Jundiá. Para esta pesquisa foram adquiridos cinco indivíduos provenientes do grupo controle de um bioensaio de exposição a efluente têxtil na piscicultura da UTFPR – Campus Dois Vizinhos. Foi coletado amostras de músculo dos indivíduos, sendo estes armazenados em temperatura de -80°C até posterior etapa de extração e amplificação do DNA. A amplificação do DNA foi realizada por duas técnicas, a primeira, denominada PCR *endpoint* caracterizada por ser uma técnica qualitativa e que foi utilizada para fornecer parâmetros iniciais para amplificar a região telomérica, uma vez que está técnica é mais acessível que a segunda técnica utilizada nesta pesquisa, denominada qPCR, também denominada PCR quantitativa. Através da qPCR é possível efetivamente mensurar o tamanho relativo dos telômeros com base na mensuração de um gene endógeno, aqui utilizado o gene GAPDH. A padronização foi obtida com sucesso tanto para telômeros quanto para o gene GAPDH, com *cycle threshold* (Ct) médio de 15,251 e 29,773, respectivamente. Através 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 *Rhamdia quelen* e o gene endógeno GAPDH é de 14,522, ou seja, são necessários 14,5 ciclos a mais para iniciar o sinal de amplificação do gene GAPDH. Através da obtenção deste valor, pode-se concluir que, em ensaios ecotoxicológicos futuros, valores abaixo de 14,522 podem significar alteração em telômeros, resultado de estresse oxidativo causados por um ou mais poluentes presentes no meio em que o bioindicador está exposto.

Palavras-chave: Telômero; Genotoxicidade; *Rhamdia quelen*; Mensuração de telômeros.

ABSTRACT

In recent decades, the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) has aimed to establish the 3Rs guideline: Replace, Reduce, and Refine. In this context, there is a need to adapt ecotoxicological tests to new bioindicators, with the adoption of fish being prioritized in new research. A field that has been gaining prominence in recent years is the measurement of telomeres, which are structures present at the ends of chromosomes and are composed of non-coding DNA, acting in DNA protection and regulation of cell senescence, delaying chromosome shortening and the eventual loss of coding gene regions at each cell division. In this scenario, this research aims to develop a standardized protocol for measuring telomeres, capable of analyzing oxidative stress caused by pollutants in neotropical fish of the species *Rhamdia quelen*, popularly known as Jundiá. For this research, five individuals from the control group of a bioassay of exposure to textile effluent at the UTFPR fish farm - *Campus Dois Vizinhas* were acquired. Muscle samples were collected from the individuals and stored at -80°C until the next DNA extraction and amplification step. DNA amplification was performed by two techniques, the first, called endpoint PCR, characterized as a qualitative technique that was used to provide initial parameters for amplifying the telomeric region, since this technique is more accessible than the second technique used in this research, called qPCR, also known as quantitative PCR. Through qPCR, it is possible to effectively measure the relative size of telomeres based on the measurement of an endogenous gene, here used the GAPDH gene. The standardization was successfully obtained for both telomeres and the GAPDH gene, with a mean cycle threshold (Ct) of 15.251 and 29.773, respectively. Using the average Cts it was possible to calculate the value of ΔCt , which provides the difference in the amount of molecules, in cycles, of the target region and the endogenous gene. The difference between the telomeric region of *Rhamdia quelen* and the endogenous GAPDH gene is 14.522, that is, 14.5 more cycles are needed to start the amplification signal of the GAPDH gene. By obtaining this value, we can conclude that, in future ecotoxicological tests, values below 14.522 may mean changes in telomeres as a result of oxidative stress caused by one or more pollutants present in the environment to which the bioindicator is exposed.

Keywords: Telomere; Genotoxicity; *Rhamdia quelen*; Telomere measurement.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação dos telômeros em uma célula eucariota	15
Figura 2 - Fluxograma da metodologia utilizada neste estudo	22
Figura 3 – Amplificação da região telomérica por técnica de PCR convencional com os primers Tel1A e Tel1B em gel de agarose.	30
Figura 4 – Amplificação do gene endógeno GAPDH em técnica de PCR convencional com primers JunGap9-F e JunGap8-R em gel de agarose	31
Figura 5 – Amplificação da região telomérica em qPCR através dos primers Rq-TEL1 E RqTEL2	33
Figura 6 – Curva de dissociação e pico de curva de dissociação dos telômeros utilizando os primers RqTEL1 e RqTEL2	34
Figura 7 – Amplificação do gene GAPDH em qPCR com os primers JunGap9-F e JunGap-R	35
Figura 8 – Curva de dissociação e pico de curva de dissociação do gene GAPDH	35
Figura 9 – Amplificação do grupo NTC para os telômeros e gene GAPDH	36
Figura 10 – Verificação da ocorrência de amplificação do grupo NTC em gel de agarose	37
Fotografia 1 - Exemplar de <i>Rhamdia quelen</i>	20
Quadro 1 - Primers selecionados na literatura e utilizados nesta pesquisa para a região telomérica	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3Rs	Replace, Reduce and Refine
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
Ct	Cycle Threshold
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
Kb	Kilobase
NBR	Normas Brasileiras
NTC	No Template Control
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pb	<i>Pares de base</i>
Q-FISH	<i>Quantitative Fluorescence In Situ Hybridization</i>
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RFU	Relative Fluorescence Units
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
RT-qPCR	Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction
STELA	<i>Single Telomere Length</i>
TRF	<i>Terminal restriction fragment</i>
UNEPE	Unidade de Pesquisa e Ensino
UTFPR-DV	Universidade Tecnológica Federal do Paraná – <i>Campus Dois Vizinhos</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

μL	Microlitro
mg	Miligrama
ml	Mililitro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
Δg	Variación da energia livre

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	Telômeros	15
2.2	Mensuração de telômeros	17
2.2.1	Reação em Cadeia da Polimerase Convencional	18
2.2.2	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real	18
2.3	Gene GAPDH	19
2.4	Peixes como bioindicadores	19
2.4.1	<i>Rhamdia quelen</i>	20
2.4.2	<i>Cyprinus carpio</i>	21
2.4.3	<i>Salmo salar</i>	21
3	METODOLOGIA	22
3.1	Obtenção das amostras	22
3.1.1	Bioensaio exposição efluente têxtil em <i>Rhamdia quelen</i>	23
3.1.2	Obtenção de <i>Cyprinus carpio</i>	23
3.1.3	Obtenção de <i>Salmo salar</i>	24
3.2	Extração de DNA	24
3.3	Seleção de primers	25
3.4	Técnica de PCR Endpoint	26
3.5	Técnica de RT qPCR	26
3.6	Análise dos resultados	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1	Resultado de amplificação por PCR convencional	28
4.2	Resultado de amplificação por Real-Time qPCR	29
4.2.1	Amplificação dos telômeros	30
4.2.2	Amplificação do gene GAPDH	31
4.3	Mensuração relativa dos telômeros	35
5	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

Os telômeros são estruturas presentes nas extremidades dos cromossomos de todos os eucariotos, sendo 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).

A mensuração de telômeros já foi bem padronizada para seres humanos (GARDNER et al., 2014). No entanto, a busca na literatura existente revelou não haver pesquisas utilizando-se de peixes de clima neotropical. A abrangência de pesquisas com bioindicadores de diversas localidades, ecossistemas e climas é necessária, pois o comprimento dos telômeros pode refletir estresse fisiológico e prever morbimortalidade subsequente, independentemente da idade cronológica (NUSSEY et al., 2014). Para a mensuração de telômeros, várias técnicas já foram descritas, entretanto, a técnica qPCR constitui o método mais utilizado atualmente, pois apresenta um custo relativamente baixo se comparada a outras técnicas utilizadas para mensuração de telômeros, podendo ser realizada utilizando-se de pequenas quantidades de DNA (LIN et al., 2019).

Para compreender melhor o contexto da utilização de peixes em pesquisas científicas, é necessário compreender que 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 e menos sencientes, como peixes (AAVS, 2014).

A adoção de peixes como modelo biológico segue 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). Além disso, sua posição evolutiva em relação a outros vertebrados e suas notáveis capacidades evolutivas faz com que estes animais sejam importantes objetos de estudo na ciência, portanto, podendo contabilizar resultados muito significativos (SCHAECK et al., 2013).

O *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardi 1824), popularmente conhecido como Jundiá, é um peixe neotropical (GOMES et al., 2000). O Jundiá 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).

A execução desta pesquisa contribui com diversos aspectos, tais como: Social; pois este protocolo desenvolvido permitirá o desenvolvimento de inúmeros ensaios toxicológicos acerca de poluentes comumente encontrados em nossa sociedade. Tecnológico; fornecendo uma técnica possível de ser utilizada pela comunidade científica em diversos laboratórios ao redor do mundo. Científicos; proporcionando um novo método de amplificação e mensuração de telômeros em um indivíduo vertebrado de clima neotropical.

Portanto, esta pesquisa tem por objetivo a elaboração de um protocolo padronizado de mensuração de telômeros em peixes de clima neotropical, visando corroborar com um método eficiente de se analisar o estresse oxidativo causado por poluentes em espécies de alta relevância em âmbito nacional e até mesmo internacional, uma vez que as respostas toxicológicas entre os vertebrados geralmente podem ser inferidas de um grupo taxonômico mais simples a outro mais complexo, ou seja, as respostas moleculares vistas em outros animais podem ser confiavelmente correlacionadas às respostas que seriam observadas em humanos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

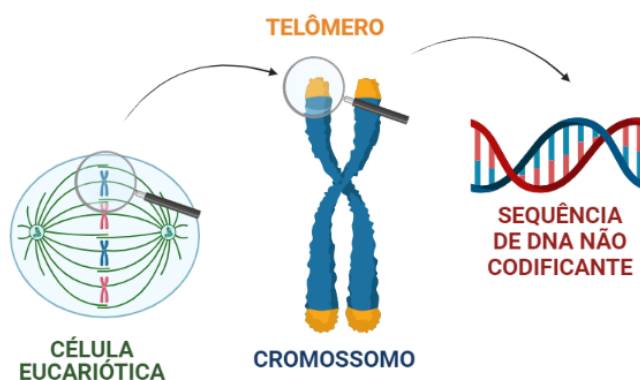
Em uma revisão da literatura realizada por Ocalewicz (2013), revelou-se que o DNA telomérico em peixes varia de 2 a 25 kb conforme a espécie. Alguns tubarões e raias apresentaram telômeros mais curtos, com cerca de 3 kb. Já o peixe-zebra (*Danio rerio*) foi o indivíduo com maior região telomérica, variando entre 16 a 25 kb.

As sessões subsequentes irão expandir o debate acerca dos conceitos e definições de telômeros e peixes como bioindicadores.

2.1 Telômeros

A palavra “telômero” é a combinação de duas palavras gregas, “*telos*” (extremidade) e “*meros*” (final), portanto, telômeros são as regiões terminais dos cromossomos (Figura 1) (SNUSTAD & SIMMONS, 2017). Estão presentes em todos os organismos eucariotos e são constituídas de sequências repetitivas de ‘TTAGGG’ (RIETHMAN et al., 2001; BLACKBURN, 1991).

Figura 1 - Representação dos telômeros em uma célula eucariota.



Created in BioRender.com 

Fonte: Autoria própria, 2021

Os telômeros foram descobertos por Hermann J. Müller em 1938, o geneticista norte-americano trabalhava com exposição de raios-x em *Drosophila melanogaster*. Ele percebeu que não havia alterações nos cromossomos irradiados como havia em outros genomas. Alguns anos após Müller, Barbara McClintock

concluiu que os telômeros também atuam na estabilização dos cromossomos, impedindo a junção entre duas partes ou dois cromossomos diferentes (CHUAIRE, 2006; CONG; WRIGHT; SHAY, 2002).

Leonard Hayflick concluiu que após um número finito de mitoses, as células somáticas do ser humano paravam de se dividir antes de morrer, ele chamou este processo de senescência e o limite de divisões desta célula é chamado de limite de Hayflick. (BLACKBURN, 2017). A cada replicação celular, os cromossomos possuem um encurtamento progressivo, devida a replicação descontínua da fita 3' → 5', chamada de fita retardada ou descontínua, pois há a necessidade de seguir no sentido contrário da abertura da dupla fita de DNA. A síntese precisa ser iniciada por um *primer* por um curto espaço e depois reiniciada por outro primer e assim por diante (COX, 2012).

A fita descontínua promove construções de DNA fragmentadas, chamados de fragmentos de Okazaki. Os *primers* de RNA utilizados como iniciadores da síntese são removidos e substituídos por regiões de DNA através da enzima Ligase. O problema ocorre nas extremidades destas fitas, pois quando o último *primer* utilizado no final da fita é removido esta região não é replicada, isto ocorre porque não existe uma extremidade 3'-OH livre onde a DNA polimerase consiga se ligar e preencher o espaço onde estava o primer (MENCK; VAN SLUYS, 2017). O encurtamento do cromossomo faria com que houvesse perda de estabilidade e principalmente deleções de regiões codificantes (PIERCE, 2017).

A resposta celular encontrada para evitar o encurtamento cromossômico foi a telomerase, ela é constituída de uma enzima e um componente de RNA (PIERCE, 2017). A enzima contém de 15 a 22 nucleotídeos e sintetiza um trecho adicional de DNA na fita parental utilizando o seu próprio RNA como fita molde. Após alongar a extremidade 3' da fita, a enzima primase sintetiza um novo primer para sinalizar o início da atividade de outra enzima, a polimerase, que poderá sintetizar uma nova fita complementar de DNA (GRIFFITHS et al., 2016). Porém, ainda assim ocorreria o problema de encurtamento da fita quando o primer é removido, pois a enzima é incapaz de chegar até o fim da fita de DNA. Contudo, a telomerase alonga a fita continua além do necessário, sendo assim apenas até a sequência original de DNA é necessário, o restante de bases pode ser removido, esta região é chamada de DNA não codificante ou "*junk DNA*" (KOBAYASHI, 2011).

A telomerase pode tornar mais lento, prevenir ou até mesmo reverter o encurtamento dos telômeros que ocorre com a divisão celular (BLACKBURN, 2017). Porém a telomerase não possui ação ativa e prolongada na maioria das células somáticas, ela é encontrada em abundância em organismos unicelulares, células germinativas, células-tronco e algumas células somáticas proliferativas (como as da medula óssea e as que revestem o intestino). As demais células do nosso corpo sofrem com o encurtamento natural de seus cromossomos e a decorrente senescência celular (SNUSTAD & SIMMONS, 2017; PIERCE, 2017).

O encurtamento está associado também ao envelhecimento, e SIMIDE et al. (2016) constatam que a idade e o estresse oxidativo corroboram com a aceleração do encurtamento telomérico. Outros estudos revelam a aceleração do encurtamento dos telômeros quando associados a obesidade (NORDFJALL et al., 2008a), gênero (GARDNER et al., 2014), tabagismo (VALDES et al., 2005), sedentarismo (CHERKAS et al., 2008) e baixa condição socioeconômica (CHERKAS et al., 2008). Há também evidências de alterações nos telômeros em agricultores que sofreram exposição a pesticidas em fazendas de tabaco (SILVA KAHL et al., 2018).

2.2 Mensuração de telômeros

A realização de pesquisas buscando a mensuração de telômeros utilizando-se de peixes foi realizada por poucos pesquisadores, porém, as pesquisas realizadas utilizam-se como bioindicadores as espécies provenientes da Ásia como em ROLLINGS; MILLER; OLSSON, (2014); IZZO, (2010) e SIMIDE et al. (2016). Também foram utilizados peixes distribuídos na Europa (MCLENNAN et al., 2016) e América do Norte (GAO; MUNCH, 2015). Não foram encontradas pesquisas desenvolvidas com peixes de clima neotropical, com peixes provenientes da América do Sul.

Uma das principais técnicas para a detecção e medição dos telômeros é através da Reação em Cadeia da Polimerase ou *Polymerase chain reaction* (PCR), devido a necessidade de baixas quantidades de DNA inicial em relação a outras técnicas como *Terminal restriction fragment* (TRF), *Quantitative Fluorescence In Situ Hybridization* (Q-FISH) e *Single Telomere Length Analysis* (STELA), além de apresentar uma demanda de esforço menor do que as demais técnicas (MONTPETIT et al., 2014; LAI; WRIGHT; SHAY, 2018). Como desvantagem, a PCR apresenta falta de padrões de referência de outros estudos.

2.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase Convencional

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica desenvolvida por Kary Mullis em 1984. A PCR é baseada na capacidade da DNA polimerase de sintetizar uma nova fita de DNA complementar à fita modelo oferecida, esse segmento curto de nucleotídeos é chamado de *primer*. Os *primers* podem ter comprimento variável, mas geralmente têm entre 15 e 30 nucleotídeos de comprimento. A sequência iniciadora é adicionada junto a uma solução contendo DNA polimerase, cada um dos quatro nucleotídeos e DNA contendo a sequência alvo (FAVROT, 2015).

De forma geral, a PCR consiste em três etapas principais. Na primeira etapa, chamada desnaturação, é utilizada uma temperatura muito alta (entre 90° e 97°C) para poder abrir a dupla fita de DNA. A segunda etapa é chamada de anelamento, neste momento a temperatura é abaixada para possibilitar a ligação dos *primers* na fita alvo de DNA. Por fim, na extensão, a temperatura é novamente elevada a fim de se promover o alongamento da nova fita de DNA (SOLANKI, 2012).

Após 25 a 40 ciclos contendo as 3 etapas descritas acima é possível transformar uma única cópia do material genético em centenas de milhares de cópias. A PCR é frequentemente utilizada no diagnóstico médico de um grande número de doenças, bem como na amplificação do DNA para sequenciamento, clonagem, análise e na detecção e medição relativa de alvos em uma reação (FAVROT, 2015).

2.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real

Para entendermos o contexto da criação e utilização da qPCR, temos que compreender que a PCR ponto final não pode ser utilizado para quantificar o produto sintetizado (LAKNA, 2018). Este método foi desenvolvido por Cawthon (2002) e permite acompanhar a formação de novas fitas duplas de DNA através de sinais fluorescentes.

A RT-qPCR todas as amostras começam com a mesma quantidade de todos os componentes de PCR e concentração de DNA no início da reação, porém, finalizam em pontos diferentes na fase de platô (fase terminal da reação), devido às diferentes cinéticas que cada amostra teve durante os ciclos. Portanto, é mais preciso fazer

medições durante a fase exponencial, onde as amostras replicadas estão amplificando exponencialmente. Já na PCR convencional os produtos são analisados na fase de platô, tornando a quantificação difícil, uma vez que a PCR fornece a mesma quantidade de produto, independentemente da quantidade inicial de moléculas de DNA que estavam presentes no início da reação (PESTANA et al., 2010).

De modo geral, ambas as PCRs funcionam da mesma forma, entretanto, os resultados provenientes da qPCR podem ser visualizados durante o processo, fornecendo mais dados sobre erros e acertos provenientes do experimento realizado. Quando comparada com outras técnicas a qPCR apresenta benefícios uma vez que a análise de Southern blot por exemplo, requer grandes quantidades de DNA, portanto, não é recomendada para estudos com quantidades limitadas de amostra. A técnica de Q-FISH requer material fresco e não se aplica a tecidos sólidos ou amostras armazenadas. Além disso, tanto a análise do TRF quanto o Q-FISH são trabalhosas e caras (LIN et al., 2019).

2.3 Gene GAPDH

A mensuração de telômeros é obtida de forma relativa a um gene chamado endógeno. Os genes endógenos são expressos de forma constante na maioria dos indivíduos, pois atuam na manutenção da atividade celular. O gene Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é um desses genes endógenos (BARBER et al., 2005).

O gene GAPDH é uma proteína multifuncional envolvida em muitos processos celulares, como: reparo de DNA, exportação de tRNA, fusão e transporte de membrana, dinâmica do citoesqueleto e morte celular (HARA; CASCIO; SAWA, 2006; TRISTAN et al., 2011).

2.4 Peixes como bioindicadores

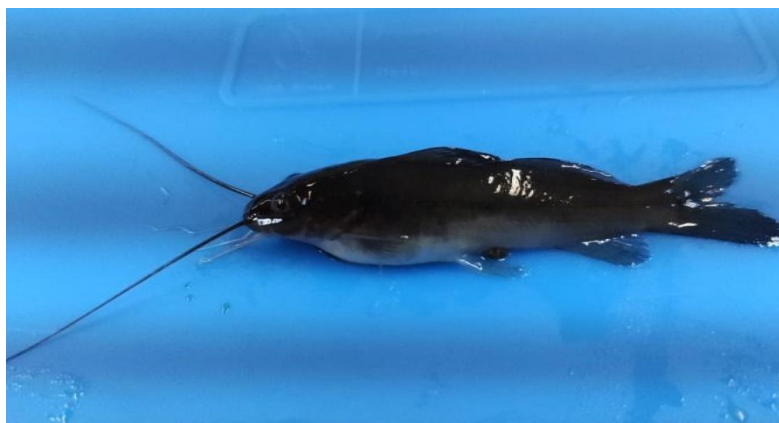
A adoção de peixes como modelo biológico segue a determinação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), que visa estabelecer a diretriz dos 3Rs: do inglês *Replace* (Substituição), *Reduce* (Redução) e *Refine* (Refinamento) (CONCEA, 2017). Além disso, sua posição evolutiva em relação a outros vertebrados e suas notáveis capacidades evolutivas faz com que estes

animais sejam importantes objetos de estudo na ciência, portanto, podendo contabilizar resultados muito significativos (SCHAECK et al., 2013).

2.4.1 *Rhamdia quelen*

O *Rhamdia quelen*, popularmente conhecido como Jundiá (Fotografia 1), é uma espécie neotropical de ampla ocorrência na América do Sul, pertencendo à ordem Siluriforme e família Pimelodidae (GOMIERO; SOUZA; BRAGA, 2007; GOMES et al., 2000). Esta espécie tem preferência por maiores profundidades em poços e lagos, optando por águas mais calmas e fundo de areia e lama, perto de margens e locais com vegetação. Durante o dia podem ficar escondidos entre pedras e troncos, e saindo apenas à noite para procurar alimento (PRETTO, 2008; JUNIOR; GARCIA, 2013), sendo este um peixe onívoro (ESQUIVEL, 2005).

Fotografia 1 – Exemplar de *Rhamdia quelen*



Fonte: Autoria própria, 2020

O *R. quelen* vem se mostrando muito promissor para cultivo e pesquisa, devido sua resistência ao manejo, rápido crescimento, inclusive com temperaturas adversas no inverno, suportando uma variação térmica de 15° C a 34° C, além de uma boa eficiência alimentar (JUNIOR; GARCIA, 2013; GOMES et al., 2000).

2.4.2 *Cyprinus carpio*

A carpa comum, *Cyprinus carpio*, pertence à ordem Cypriniforme e à família Cyprinidae, a qual é considerada a maior família de peixes de água doce. É amplamente distribuído em quase todos os países do mundo, sendo uma espécie nativa da Europa Oriental e Ásia Central (TESSEMA et al., 2020; RAHMAN, 2015)

Quando em estágio juvenil, seu alimento natural é o zooplâncton, em sua forma adulta, se alimenta principalmente de animais bentônicos (LOPES, 2012). É uma das espécies mais importantes comercialmente, sendo responsável por 10% da produção de aquicultura de água doce (XU et al., 2014).

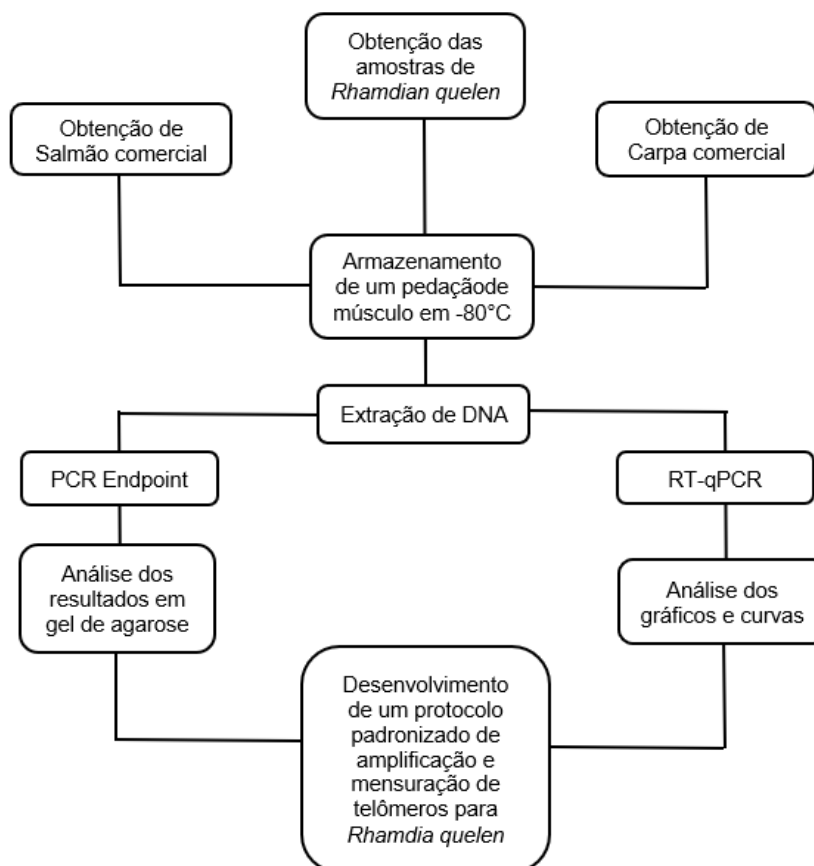
2.4.3 *Salmo salar*

O salmão é o nome popular atribuído a uma grande variedade de espécies pertencentes à família Salmonidae, podendo ser comercialmente classificados como salmão-do-atlântico (gênero *Salmo*, espécie *S. salar*) ou salmão-do-pacífico (gênero *Oncorhynchus*, espécies *O. kisutch*, *O. keta*, *O. gorbuscha*, *O. tshawytscha* e *O. masou*) (Carrera et al., 1999; Zhang et al., 2007; Herrero et al., 2011; Hafsa et al., 2016; Brasil, 2016; GONÇALVES et al., 2019).

3. METODOLOGIA

A Figura 2 apresenta um fluxograma resumido contendo todas as etapas desta pesquisa.

Figura 2 - Fluxograma da metodologia utilizada neste estudo



Fonte: Autoria própria, 2021

3.1 Obtenção das amostras

Além da espécie alvo de interesse deste estudo (*Rhamdia quelen*), utilizou-se outras duas espécies de peixes amplamente distribuídas no mundo inteiro e que já possuem trabalhos publicados de mensuração de telômeros, são elas a carpa comum (*Cyprinus carpio*) (IZZO, 2010) e o Salmão (*Salmo salar*) (McLennan et. al, 2016).

A utilização destas duas espécies adicionais teve como único propósito a comparação de resultados, uma vez que para tais espécies já possui protocolos padronizados.

3.1.1 Obtenção das amostras biológicas de *Rhamdia quelen*

Os alevinos de Jundiá com cerca de 21 dias de idade foram aclimatados por um período de 20 dias na UNEPE (Unidade de Pesquisa e Ensino) piscicultura de UTFPR-DV 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 sub-letais de 1,25; 2,5; 5; 7,5 e 10% de efluente bruto e, posteriormente, efluente tratado, conforme protocolo descrito pela NBR-15088 (ABNT, 2016). Os ensaios contaram também com um grupo controle, onde possuía apenas água nas caixas.

O ensaio semi-estático contou com renovação de 12,5% da solução a cada 24 horas. Diariamente foram aferidos parâmetros como temperatura, pH, nível de oxigênio, nitrito e amônia da água. Após 168 horas de exposição foram coletadas amostras de músculo de 140 peixes (70 peixes expostos à efluente têxtil bruto e 70 peixes expostos à efluente têxtil tratado) e estocadas em temperatura de -80° C até o processamento.

Para esta padronização, foram utilizados apenas cinco peixes do grupo controle referente ao bioensaio contendo efluente têxtil bruto. Portanto, para esta pesquisa foram utilizados cinco indivíduos referente a espécie *Rhamdia quelen*. As demais amostras de músculos coletadas, porém não utilizadas, seguem armazenados em temperatura de -80° C e poderão ser utilizados em pesquisas futuras.

3.1.2 Obtenção de *Cyprinus carpio*

Um exemplar da espécie *Cyprinus carpio*, popularmente conhecida como carpa, foi adquirida através da doação de um pesque-pague local e armazenada em temperatura de -20° C até a etapa de extração de DNA.

3.1.3 Obtenção de *Salmo salar*

Um exemplar da espécie *Salmo salar*, popularmente conhecida como salmão, foi adquirida através da doação de uma peixaria local e armazenada em temperatura de -20° C até a etapa de extração do DNA.

3.2 Extração de DNA

Para a etapa de extração, as amostras foram descongeladas. O protocolo de extração do kit Wizard Promega® foi utilizado. O kit é baseado em um processo de quatro etapas. A primeira envolve na lise das membranas celular e nuclear, seguida de uma etapa de digestão de RNA, em seguida ocorre a precipitação e remoção de proteínas e pôr fim, a precipitação e concentração do DNA genômico (PROMEGA, 2009).

O protocolo de extração teve início com o auxílio de uma pinça e um bisturi, onde foi fracionada uma porção de músculo de aproximadamente 20mg em microtubo de 1,5 ml e macerada utilizando *pestles*. Em seguida foram adicionados 600 µl de solução tampão “*Nuclei Lysis Solution*” e 12,5 µl de Proteinase K, esta solução foi encubada então em banho maria por aproximadamente 1 hora à 55° C. Após a encubação, a solução foi centrifugada por 1 minuto à 8.000 rpm e logo em seguida retirado o sobrenadante, passando-o para um novo Eppendorf de 1,5 ml. Posteriormente, foi adicionado mais 1,5 µl de *RNAse Solution* e incubando novamente por 30 minutos à 37°C. Em sequência foi retirado do banho-maria e deixado que a solução fique a temperatura ambiente por 5 minutos, adicionando ao fim deste tempo 200 µl do tampão “*Protein Precipitation Solution*”, agitando-o vigorosamente (vortex) por 20 segundos e deixando no gelo por 5 minutos, logo após a solução foi novamente centrifugada à 14.000 rpm por 4 minutos, tendo por fim seu sobrenadante transferido para um novo microtubo de 1,5 ml. Depois foram adicionados 300 µl de Isopropanol à temperatura ambiente e levado para a centrifuga a 14.000 rpm por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente. Em sequência foi adicionado 600 µl de etanol 70% em temperatura ambiente e levado novamente para a centrifuga por 2 minutos à 14.000 rpm, em seguida, com auxílio de uma micropipeta, o sobrenadante

foi retirado e descartado, o tubo foi invertido e deixado secar em papel absorvente. Por fim, ressuspender em 70µl de *DNA Rehydration* e homogeneizado com a pipeta.

3.3 Seleção de *primers*

Uma das etapas mais importantes para a realização de uma PCR, seja ela *endpoint* ou quantitativa, é a seleção dos *primers* mais adequados para seu alvo. A espécie *Rhamdia quelen* não possui seu genoma sequenciado, portanto, fez se necessário uma revisão da literatura a fim de se encontrar sequências de indivíduos mais próximos filogeneticamente. Os *primers* selecionados para esta pesquisa podem ser encontrados no quadro 1.

Quadro 1 – *Primers* selecionados na literatura e utilizados nesta pesquisa para a região telômérica

Nome	Espécie do trabalho
RqTEL1	<i>Acipenser baerii</i>
RqTEL2	
Tel1a	<i>Coregonus peled</i>
Tel1b	
Tel1	<i>Menidia menidia</i>
Tel2	

Fonte: Autoria própria, 2021

3.4 Técnica de PCR *Endpoint*

A técnica de qPCR é mais cara e sensível que a PCR convencional, portanto, a fim de otimizar recursos como reagentes, *primers* e tubos, foi realizada a PCR convencional anteriormente à qPCR. Portanto, para esta etapa de prospecção de amplificação por PCR, foi montada uma reação preparada para um volume final de 20 µL, sendo constituído de 2X PCR Taq MasterMix abm; *Primer Forward* Tel1a; *Primer*

Reverse Tel1b, H2O *RNAase free* e DNA. Para o procedimento, foi utilizado o termociclador SimpliAmp™ Thermal Cycler configurado conforme recomendação do fabricante. Todas as reações foram realizadas em duplicatas.

3.5 Técnica de RT qPCR

Para a realização da qPCR foi utilizado o aparelho CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System. Foi preparada uma reação final de 20 µL, sendo constituído de SYBR™ Select Master Mix para CFX; *Primer Foward* RqTEL1; *Primer Reverse* RqTEL2, H2O *RNAase free* e DNA. O aparelho de termociclador foi configurado conforme recomendação do fabricante, sendo que, ao final de cada ciclo ocorreu a leitura dos tubos. Foi adicionado também uma etapa final chamada de *Melt Curve*, com o intuito de verificar a amplificação de apenas um fragmento específico de DNA. Todas as reações foram realizadas em duplicatas.

3.6 Análise dos resultados

Para análise dos resultados da PCR convencional foi utilizado o procedimento de eletroforese à 80 Volts, por 1 hora em gel de agarose 2%. Os fragmentos de DNA, após a ativação da corrente de energia, começam a migrar do polo negativo para o polo positivo. Fragmentos menores migram mais rápido, enquanto fragmentos maiores migram mais lentamente. O resultado é visualizado através do aparelho de fotodocumentador.

As curvas e gráficos provenientes do resultado da qPCR foram analisados através do software Bio-Rad CFX Maestro 1.1. Para a obtenção do tamanho relativo dos telômeros, foi utilizada a fórmula:

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

A fórmula apresenta a diferença entre a média dos *Cycle Threshold* (Cts) teloméricos e do gene constitutivo. Além do gene GAPDH não sofrer variação pelo tratamento experimental é também um gene de cópia única, ou seja, aparece apenas uma única vez no genoma, o que permite a comparação relativa entre os grupos,

gerando a variação de CT ou Δ CT negativo, isso representa a quantidade de ciclos a mais que o gene constitutivo de cópia única necessita para alcançar a produção máxima de fluorescência dos telômeros. O valor convertido para positivo se torna expoente do fator de amplificação 2, que representa a metodologia da amplificação exponencial da PCR a partir de uma fita dupla de DNA. O valor encontrado representa o tamanho relativo do telômero (SILVA, 2016).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

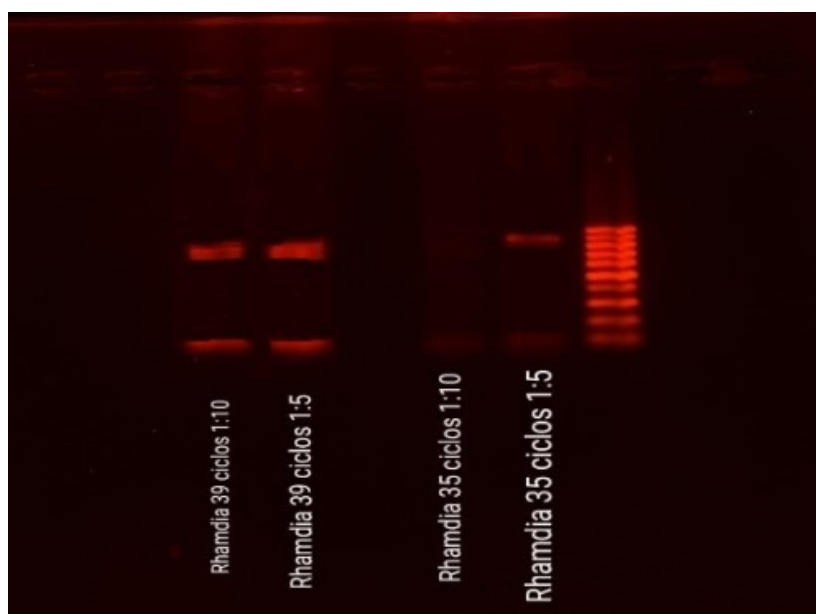
Os resultados advindos desta pesquisa seguem uma ordem de eventos, desde a padronização da técnica em PCR convencional e visualização por meio da eletroforese em gel de agarose até a padronização da técnica e mensuração dos telômeros em qPCR.

4.1 Resultado de amplificação por PCR convencional.

A fim de se encontrar uma amplificação satisfatória do material genético, foi realizado uma série de tentativas onde diversas variáveis foram testadas.

O melhor resultado encontrado para amplificação de telômeros através da técnica de PCR convencional seguiu as condições de procedimentos descritos na seção 3.4, com os *primers* Tel1a e Tel1b. Através da visualização da Figura 3, é possível observar a amplificação de fragmentos únicos de DNA entre 800 à 900 pares de base, com um rendimento de 10 ng/ μ l.

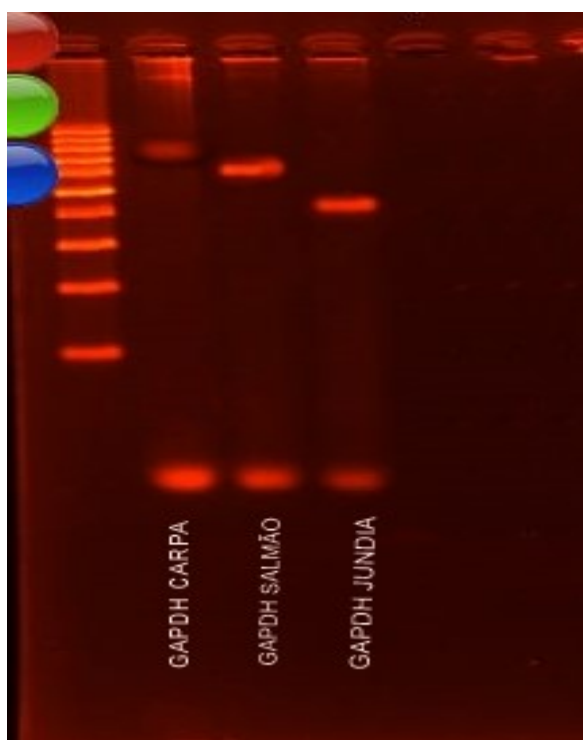
Figura 3 - Amplificação da região telômerica por técnica de PCR convencional com os *primers* Tel1A e Tel1B em gel de agarose.



Fonte: Autoria própria, 2021

Apesar da técnica de PCR convencional não fornecer resultados quantitativos, ou seja, não é possível medir efetivamente o tamanho dos telômeros, ela fornece um meio mais economicamente viável para se estabelecer condições iniciais para possível amplificação e posterior mensuração dos telômeros na técnica quantitativa, no caso, a técnica de qPCR. O gene endógeno também foi padronizado previamente ao início da qPCR (Figura 4).

Figura 4 - Amplificação do gene endógeno GAPDH em técnica de PCR convencional com primers JunGap9-F e JunGap8-R em gel de agarose



Fonte: Autoria própria

A amplificação variou entre espécies, sendo que para a espécie alvo, o jundiá, ficou por volta de 400 pares de base, também com um rendimento de 10 ng/ μ l e utilizando-se dos primers JunGap9-F e JunGap8-R. Constata-se assim que os primers para a região telomérica tel1a e tel1b forneceram uma amplificação satisfatória para a espécie alvo, assim como os primers para gene endógeno GAPDH.

4.2 Resultado de amplificação por Real-time qPCR

Para a etapa em RT-qPCR foram estabelecidos parâmetros mínimos para validação de amplificação, tais como: *Ct* inferior a 30 ciclos; fluorescência acima de 5000 RFU; e formação de um único pico de *curva de dissociação*. Os fatores são arbitrários e definidos conforme resultados obtidos no grupo NTC (*No Template Control*). Esses valores são definidos para se obter um controle de qualidade da reação.

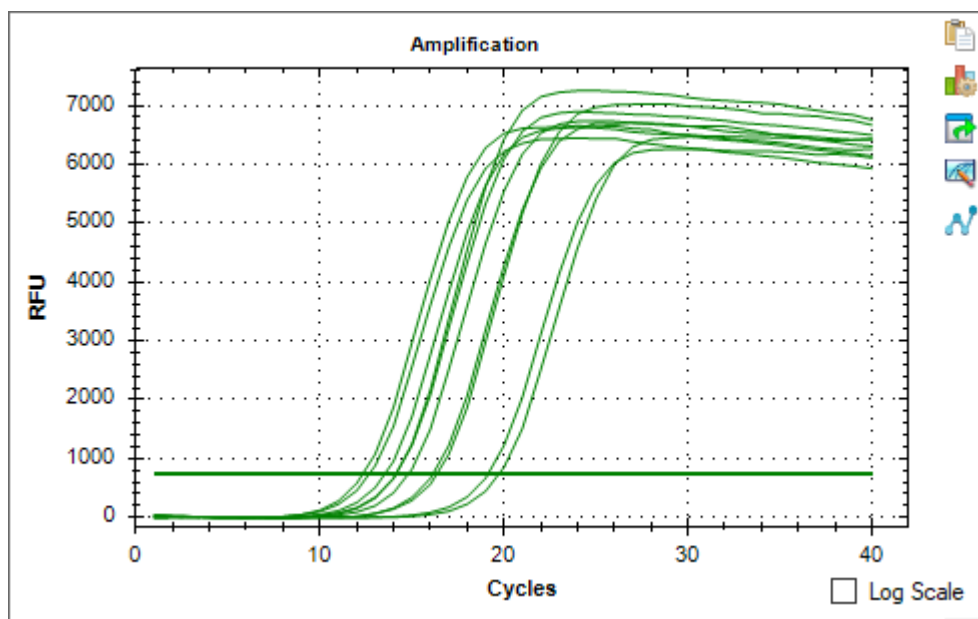
4.2.1 Amplificação dos telômeros

Os *primers* e condições utilizadas para amplificação em PCR convencional foram mantidos para a etapa de qPCR, entretanto não foi encontrada uma amplificação satisfatória do material genético. O *Ct* médio das amostras foi de 35,3425, o que segundo VATS (2016), é tardio. A amplificação apresentou variação entre as réplicas amostrais. De semelhante forma, a curva de dissociação revelou a formação de vários fragmentos de DNA, através do aparecimento de diversos picos de amplificação.

De semelhante forma ao que ocorreu na etapa de PCR convencional, diversas variáveis foram testadas a fim de se encontrar uma amplificação satisfatória.

Utilizando-se o primer RqTEL1 e RqTEL2 e as condições descritas na seção 3.5, foi possível se obter a amplificação da região telomérica (Figura 5). A média entre indivíduos revelou *Ct* de 15,251, ou seja, foram necessários 15 ciclos, aproximadamente, em média para que o sinal de fluorescência amplificado fosse detectado. O desvio padrão médio entre as amostras foi de 0,34.

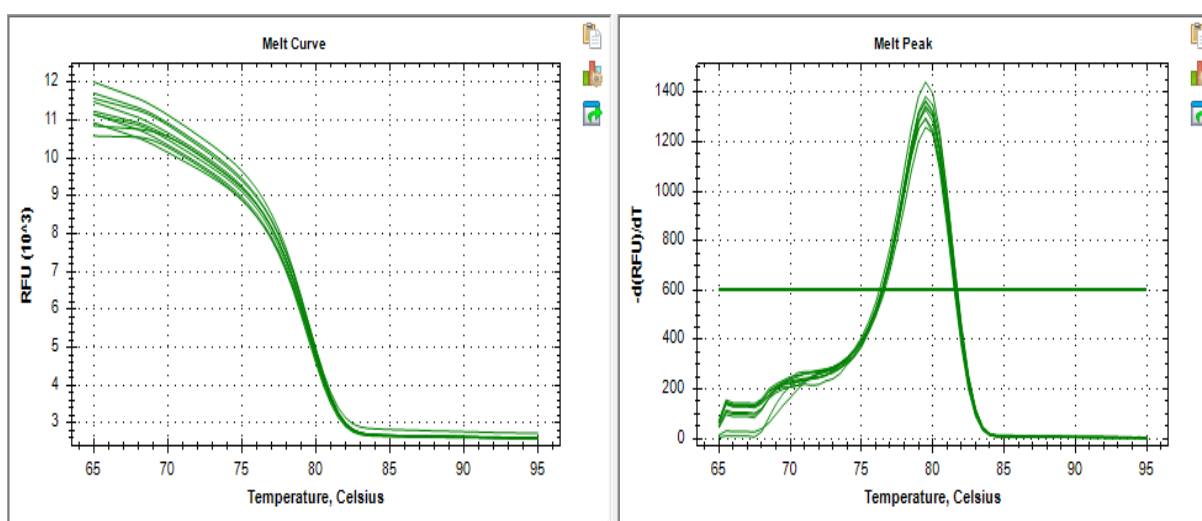
Figura 5 - Amplificação da região telomérica em qPCR através dos *primers* Rq-TEL1 E RqTEL2



Fonte: Autoria própria, 2021

A temperatura do pico da curva de dissociação para todas as amostras ficou em 79,5° C, enquanto que a fluorescência obtida foi na média de 1.341,732 RFU/dT conforme exposto na (Figura 6). A presença de apenas um *pico* indica formação de apenas um tamanho de fragmento de DNA amplificado.

Figura 6 - Curva de dissociação e pico de curva de dissociação dos telômeros utilizando os *primers* RqTEL1 e RqTEL2



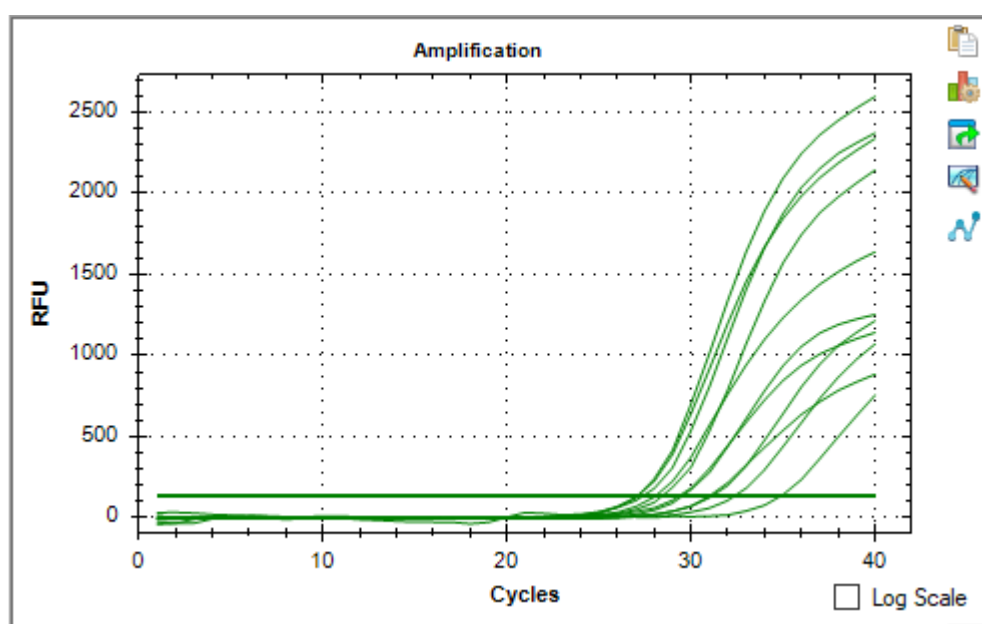
Fonte: Autoria própria, 2021

4.2.2 Amplificação do gene GAPDH

De semelhante forma, para a mensuração relativas dos telômeros, é necessária a padronização e amplificação de um gene endógeno de cópia simples no genoma que, para esta pesquisa, foi utilizado o gene GAPDH. O procedimento foi realizado de forma semelhante ao utilizado para os telômeros, entretanto, a temperatura de anelamento para os *primers* JunGap-F e JunGap-R (*Primers* para o gene GAPDH) foi de 52° C.

O resultado pode ser conferido na Figura 7. O gene GAPDH apresentou uma amplificação mais tardia (Média de 29,773 ciclos para início da detecção de sinal e desvio padrão de 1,73). Entretanto, conforme DAHLGREN et al. (2018), genes endógenos, em geral, apresentam uma amplificação posterior em relação à telômeros, pelo fato de estarem em menor quantidade no genoma.

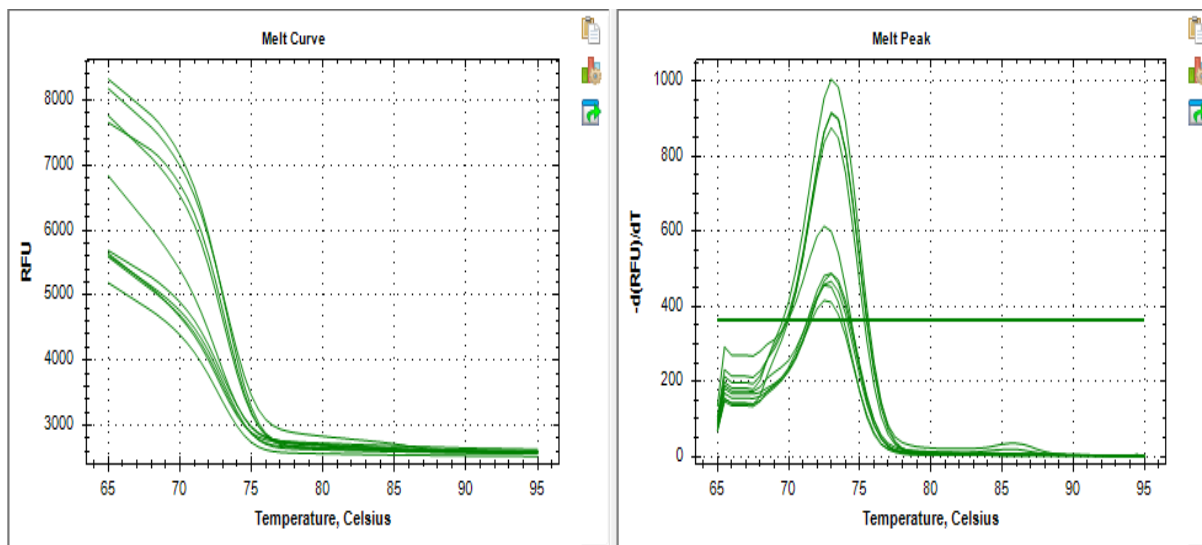
Figura 7 - Amplificação do gene GAPDH em qPCR com os *primers* JunGap9-F e JunGap8-R



Fonte: Autoria própria, 2021

A *curva de dissociação* apresentou apenas um pico de amplificação, o que indica a amplificação de apenas um tamanho de fragmento de DNA, com temperatura média de 72,50° C e uma média de 663,841 RFU/dT (Figura 8).

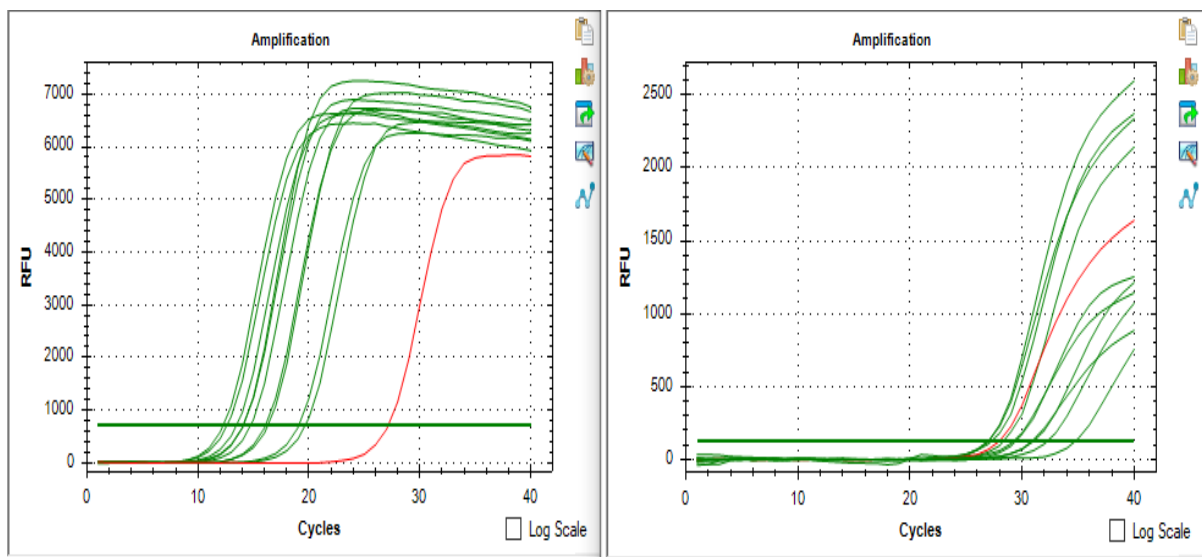
Figura 8 - Curva de dissociação e pico de curva de dissociação do gene GAPDH



Fonte: Autoria própria, 2021

Tanto a amplificação da região telomérica, quanto o gene endógeno seguiram todos os pré-requisitos estabelecidos no início desta seção para uma amplificação desejável. Entretanto, juntamente com as amostras-alvo, foi inserido um poço denominado NTC (*No template Control*), no qual não há presença de DNA, apenas SYBR Green, Primers e H₂O. Espera-se que este controle não apresente amplificação, uma vez que não possui *template* de DNA, todavia, para ambas as amostras (Telômeros e GAPDH) houve emissão de fluorescência conforme a Figura 9.

Figura 9 - Amplificação do grupo NTC para os telômeros e gene GAPDH

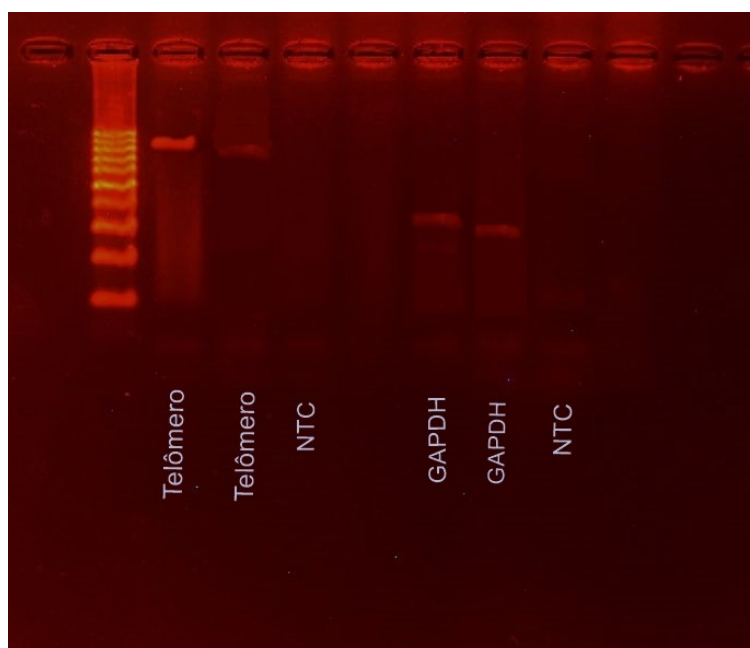


Fonte: Autoria própria, 2021

À esquerda à amplificação relativa à telômeros, à direita à amplificação relativa ao gene GAPDH. Linhas verdes representam a fluorescência produzida pelas amostras, enquanto que as linhas vermelhas são referentes ao NTC.

O produto de PCR obtido foi submetido a eletroforese para observar a possível formação de fragmentos de DNA no grupo NTC, o resultado está exposto na Figura 10.

Figura 10 - Verificação da ocorrência de amplificação do grupo NTC em gel de agarose



Fonte: Autoria própria, 2021

De forma geral, há duas fontes principais de amplificação no NTC, a primeira delas é a contaminação de um ou mais reagentes. Para assegurar que não havia contaminação no procedimento, pipetas e bancada foram higienizadas com álcool 70%, apenas ponteiros com filtro foram utilizadas, grupo NTC foi preparado de forma independente dos grupos com amostra e imediatamente lacrados. Foi realizado também uma PCR na qual apenas água e SYBR estavam presentes e outra onde apenas água, SYBR e DNA estavam presentes. Não houve amplificação nestes grupos, o que sugere fortemente que não houve contaminação em tais procedimentos.

A segunda principal fonte de amplificação da amostra NTC é a formação de dímero de *primers*. Dímeros de *primer* ocorrem quando dois *primers* de PCR se ligam a uns aos outros em vez de para o alvo. A formação de dímeros-primer é mais

frequentemente em NTCs, pois, há uma abundância de primer e nenhum modelo de DNA (BONAB et al., 2015).

Através do programa OligoAnalyzer ® foi possível determinar a possibilidade de que os primers selecionados formem dímeros, tanto entre si próprios (*Self-dimer*), quanto com sua fita complementar (*Hetero-dimer*). É recomendado que um *primer* não possua $\Delta g \leq -9$ kcal/mol, o primer RqTEL1 apresentou Δg de -83,77 kcal / mol, RqTEL2 apresentou -79,44 kcal / mol. O Δg entre RqTEL1 e RqTEL2 foi de -83,77 kcal / mol. O problema de amplificação do NTC com telômeros já foi documentada por D'haene et al. (2010), Morinha et al. (2020) e OLSEN et al. (2012), que argumentam não ser significativa a amplificação dos produtos de NTC após 8 à 10 ciclos. Já Hsieh et al. (2016) recomenda a realização da PCR usando apenas 27-30 ciclos, a fim de se evitar a formação de dímeros.

No mesmo programa foi analisado também os primers para o gene endógeno, os valores encontrados de Δg foram: JunGap-F -39.89 kcal/mol e JunGap-R -40,37 kcal/mol. O Δg entre junGAP-F e JunGap-R foi de -40,37 kcal/mol. Uma amplificação semelhante também ocorreu em BANASIK; STANISŁAWSKA-SACHADYN; SACHADYN, (2016) e RÁCZ et al. (2019), sendo que este último desempenhou sua PCR em um aparelho termociclador semelhante ao realizado nesta pesquisa.

4.3 Mensuração relativa dos telômeros

Baseando-se na fórmula descrita por Cawthon (2002), apresentada na seção 3.6 desta pesquisa, o valor médio de Ct para telômeros foi de 15,251, enquanto que o valor obtido para o gene GAPDH foi de 29, 773. Sendo assim:

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

$$\left[\frac{2^{15,251}}{2^{29,773}} \right]^{-1} = 2^{-\Delta Ct} \quad (3)$$

$$2^{-(15,251-29,773)} = 2^{-\Delta Ct} \quad (4)$$

$$2^{14,522} = 2^{-\Delta Ct} \quad (5)$$

$$\Delta Ct = 14,522 \quad (6)$$

Portanto, pode-se inferir que os telômeros em *Rhamdia quelen* são expressos 14,5 ciclos antes do gene endógeno GAPDH. O Gene endógeno GAPDH já foi sequenciado por LIU et al. (2016) e apresentou 5880 pares de bases. Para pesquisas posteriores, ΔCt menores que 14,5 poderão significar um encurtamento telomérico em *Rhamdia quelen* juvenis.

5. CONCLUSÃO

A amplificação relativa dos telômeros pode ser útil para inúmeros ensaios ecotoxicológicos. Através do método desenvolvido nesta pesquisa, é possível inferir sobre o tamanho relativo de telômeros expostos aos mais diversos poluentes e contaminantes, expandindo assim, nosso conhecimento acerca de produtos e resíduos nocivos à saúde humana e ao meio ambiente.

Para a realização de mais ensaios toxicológicos com o bioindicador *Rhamdia quelen* recomenda-se o sequenciamento genômico de tal espécie. O jundiá é uma espécie de extrema importância na América do Sul e, portanto, a completa compreensão acerca da espécie é fundamental.

O fluoróforo SYBR *green*, assim como nesta pesquisa, é amplamente utilizado em pesquisas devido a sua fácil acessibilidade, entretanto, não possui como característica a especificidade ao DNA alvo, uma vez que irá se ligar e emitir fluorescência a qualquer fita dupla que encontrar, essa característica pode facilitar o surgimento de dímeros de *primers*. É recomendado também a utilização de fluoróforos com características mais específicas, com o objetivo de evitar sinais provenientes de dímeros de *primers*.

Com esta pesquisa espera-se abrir caminho para uma ampla gama de pesquisas científicas envolvendo medição de telômeros, uma vez que estas estruturas são uma importante fonte de contaminação por poluentes.

REFERÊNCIAS

- AAVS. Which Animals Are Used: **Fish. American Anti-Vivisection Society**. 2014. Disponível em: <https://aavs.org/animals-science/animals-used/fish/>. Acesso em: 1 nov. 2021.
- ABNT NBR 15088: 2016. **Ecotoxicologia Aquática** – Toxicidade aguda: método de ensaio com peixes.
- BANASIK, M.; STANISŁAWSKA-SACHADYN, A.; SACHADYN, P. A simple modification of PCR thermal profile applied to evade persisting contamination. **Journal of Applied Genetics**, v. 57, n. 3, p. 409–415, 2016.
- BLACKBURN, E. H. Structure and function of telomeres. **Nature**. 1991.
- 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.
- BARBER, R. D. et al. GAPDH as a housekeeping gene: Analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. **Physiological Genomics**, v. 21, p. 389–395, 2005.
- BONAB, M. M. et al. Real-time PCR handbook. **Lab Chip**, v. 4, n. 2, p. 189–200, 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de inspeção para identificação de espécies de peixes e valores indicativos de substituições em produtos da pesca e aquicultura**. Brasília, 2016. 188 p.
- CARRERA, E. et al. Salmon and trout analysis by PCR-RFLP for identity authentication. **J. Sci.**, v.64, p.410-413, 1999.
- CAWTHON, RM. Telomere Measurement by Quantitative PCR. **Nucleic Acids Research**, Salt Lake City, v.30, n.10, p.47, 2002.
- CHERKAS, L.F. et al. The association between physical activity in leisure time and leukocyte telomere length. **Arch Intern Med**. 2008.
- CHUAIRE, L. Telomere and Telomerase: Brief review of a history initiated by Hermann Müller and Barbara McClintock. **Colomb. Med. Cali** , v. 37, n. 4, p. 332-335, 2006 . Disponível em: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95342006000400014&lng=en&nrm=iso>. acesso em 06 Mai. 2020.
- CONCEA, (CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL). RN 34. **Peixes**. 2017, p. 1–57.
- CONG, Yu-Sheng; WRIGHT, Woodring E.; SHAY, Jerry W. Human telomerase and its regulation. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, n. 3, p. 407-425, 2002.
- COX, M. M.; DOUDNA, J. A.; O'DONNELL, M. Biologia molecular: princípios e técnicas. Porto Alegre: **Artmed**, 2012.

D'HAENE, B., VANDESOMPELE, J., & HELLEMANS, J.. Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. 2010. **Methods**, 50, 262–270. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.12.007>

DAHLGREN, P. N. et al. Development of a New Monochrome Multiplex qPCR Method for Relative Telomere Length Measurement in Cancer. **Neoplasia (United States)**, v. 20, n. 5, p. 425–431, 2018.

FAVROT, F. Polymerase chain reaction: advantages and drawbacks. **Congresso Latinoamericano de Dermatologia Veterinaria**, v. 3, n. November, 2015.

GAO, J.; MUNCH, S. B. Does reproductive investment decrease telomere length in *Menidia menidia*? **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–13, 2015.

GARDNER, M. et al. Gender and telomere length: Systematic review and metaanalysis. **Experimental Gerontology**, v. 51, p. 15–27, 2014.

GONÇALVES, E. P. M. et al. Standardization of a PCR for the authentication of *Salmo salar* in dishes of Japanese cuisine. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 71, n. 2, p. 640–646, 2019.

GOMES, L. DE C. et al. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 179–185, mar. 2000.

GOMIERO, L. M.; SOUZA, U. P.; BRAGA, F. M. DE S. Reprodução e alimentação de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) em rios do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, SP. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 3, p. 127–133, 2007.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. Introdução à genética. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. 11. Ed., 2016.

HAFSA, A.B.; NABI, N.; ZELLAMA, M.S. et al. A new specific reference gene based on growth hormone gene (GH1) used for detection and relative quantification of Aquadvantage GM salmon (*Salmo salar* L.) in food products. **Food Chem.**, v.190, p.1040-1045, 2016.

HARA, M. R.; CASCIO, M. B.; SAWA, A. GAPDH as a sensor of NO stress. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1762, n. 5, p. 502–509, 2006.

HERRERO, B.; VIEITES, J.M.; ESPINEIRA, M. Authentication of atlantic salmon (*Salmo salar*) using real-time PCR. **Food Chem.**, v.27, p.1268-1272, 2011.

HSIEH, A. Y. et al). Optimization of a relative telomere length assay by monochromatic multiplex real-time quantitative PCR on the LightCycler 480: Sources of variability and quality control considerations. 2016. **Journal of Molecular Diagnostics**, 18, 425–437. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.01.004>

IZZO, C. Patterns of telomere length change with age in aquatic vertebrates and the phylogenetic distribution of the pattern among jawed vertebrates. **Journal and Proceedings of the Royal Society of New South Wales**, v. 145, n. April, p. 91–92, 2010

JÚNIOR, H. A. (Org.); GARCIA, S.(Org.). O Jundiá *Rhamdia quelen* - Relatos de avanços no cultivo do peixe de água doce nativo mais promissor da região sul do Brasil. 1ª Edição. Camboriú SC. **EPAGRI/CNPQ/MPA/FAPESC**. 2013. 60 p.

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.

KOBAYASHI, T. How does genome instability affect lifespan?: Roles of rDNA and telomeres T Kobayashi rDNA, telomeres and aging. **Genes to Cells**, v. 16, n. 6, p. 617–624, 2011.

LAKNA. **Difference Between PCR and QPCR**. Pediaa. 2018. Disponível em: <https://pediaa.com/difference-between-pcr-and-qpcr/>. Acesso em: 2 nov. 2021.

LAI, T. P.; WRIGHT, W. E.; SHAY, J. W. Comparison of telomere length measurement methods. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 373, n. 1741, 2018.

LIN, J. et al. Telomere length measurement by qPCR – **Summary of critical factors and recommendations for assay design**. p. 271–278, 2019.

LIU, Z. et al. The channel catfish genome sequence provides insights into the evolution of scale formation in teleosts. **Nature Communications**, v. 7, p. 1–13, 2016.

MORINHA, F.; MAGALHÃES, P.; BLANCO, G. Standard guidelines for the publication of telomere qPCR results in evolutionary ecology. **Molecular Ecology Resources**, v. 20, n. 3, p. 635–648, 2020.

NORDFJALL, K. et al. Increased abdominal obesity, adverse psychosocial factors and shorter telomere length in subjects reporting early ageing; the MONICA Northern Sweden Study. **Scand J Public Health**. 2008a.

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.

OCALEWICZ, K. Telomeres in fishes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 141, n. 2–3, p. 114–125, 2013.

OLSEN, M. T. et al. Empirical evaluation of humpback whale telomere length estimates; quality control and factors causing variability in the singleplex and multiplex qPCR methods. **BMC Genetics**, v. 13, n. 2012, 2012.

PESTANA, E. et al. Early, rapid and sensitive veterinary molecular diagnostics - real time PCR applications. **Early, rapid and sensitive veterinary molecular diagnostics - real time PCR applications**, 2010.

PIERCE, B. A. *Genética: um enfoque conceitual* Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan** 5. Ed., 2017.

PRETTO, A. **Parâmetros toxicológicos em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos ao cádmio**. 2008. 117 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) –

Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

PROMEGA. **Wizard® Genomic DNA Purification Kit**. p. 21, 2009.

RÁCZ, G. A. et al. Evaluation of critical design parameters for RT-qPCR-based analysis of multiple dUTPase isoform genes in mice. **FEBS Open Bio**, v. 9, n. 6, p. 1153–1170, 2019.

RAHMAN, M. M. Role of common carp (*Cyprinus carpio*) in aquaculture production systems. **Frontiers in Life Science**, v. 8, n. 4, p. 399–410, 2015.

ROLLINGS, N.; MILLER, E.; OLSSON, M. Telomeric attrition with age and temperature in Eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). **Naturwissenschaften**, v. 101, n. 3, p. 241–244, 2014.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. *Histologia: texto e atlas*. 7. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2018. E-book. Disponível em: <https://webapp.utfpr.edu.br/bibservices/minhaBiblioteca?ISBN=9788527729888>. Acesso em: 18 maio 2021.

SCHAECK, M. Et al. **Fish as Research Tools: Alternatives to In Vivo Experiments. Alternatives to Laboratory Animals**. 2013, pp. 219–229. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/026119291304100305>. Acesso em: 26 Out. 2020.

SILVA, T. E. C. **Padronização da técnica de qPCR para quantificação do comprimento relativo telomérico em *Caenorhabditis elegans***. Belo Horizonte. 2016. Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de medicina. 64f.

SILVA KAHL, V. F. et al. Chronic occupational exposure endured by tobacco farmers from Brazil and association with DNA damage. **Mutagenesis**, v. 33, n. 2, p. 119–128, 2018.

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, 604 p., Rio de Janeiro: **Editora Guanabara**, 2017.

SOLANKI, G. IJPR. **Scholar Science Journals**. Volume 2 Issue 2.. Gaurav Solanki Review Article. v. 2, n. 2, p. 81–82, 2012.

TESSEMA, A. et al. Reproductive biology of common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) in Lake Hayq, Ethiopia. **Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 23, n. 1, 2020.

TRISTAN, C. et al. The diverse functions of GAPDH: Views from different subcellular compartments. **Cellular Signalling**, v. 23, n. 2, p. 317–323, 2011.

VALDES, A. M. et al. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in woman. **Lancet**. 2005.

VATS, Abhishek. Re: **Is Ct values above 35 in RT PCR run acceptable or not?**. 2016. Retrieved from: <https://www.researchgate.net/post/Is-Ct-values-above-35-in-RT-PCR-run-acceptable-or-not/568cc3537eddd394018b4589/citation/download>.

XU, P. et al. Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*. **Nature Genetics**, v. 46, n. 11, p. 1212–1219, 2014.

ZHANG, J.; WANG, H.; CAI, Z. The application of DGGE and AFLP-derived SCAR for discrimination between atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Food Control**, v.18, p.672-676, 2007.