

ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DO GENE *CFTR* E IMPACTOS REPRODUTIVOS EM ZEBRAFISH EXPOSTOS À ÁGUA CONTAMINADA PELAS ENCHENTES DE MAIO DE 2024 NO RIO GRANDE DO SUL

OLENKA ROCHA PAIVA¹; NATIÉLI MACHADO GONÇALVES²; MARIANA HÄRTER REMIÃO³; LEANDRO SILVA NUNES⁴; ANTÔNIO DUARTE PAGANO⁵; TONY LEANDRO REZENDE DA SILVEIRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – olenkapaiva.op.op@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – natielimgoncalves@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – mh.remiao@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – leandro_donfa@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – antoniouduartepagano@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – silveira.tlr@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas constituem uma temática de alta relevância, uma vez que dados recentes indicam um aumento progressivo na frequência de eventos climáticos extremos, tornando-se uma realidade cada vez mais presente no Sul do Brasil. A enchente de 2024 no Rio Grande do Sul tornou-se um dos eventos mais extremos de desastres hidrológicos do estado, afetando 92% dos municípios através de chuvas volumosas e resultando em contaminação ambiental, principalmente na Laguna dos Patos (BRASIL DE FATO, 2024).

Com proporções históricas, tais eventos não se restringem às perdas socioeconômicas, os danos humanos e ambientais também requerem atenção e investigações aprofundadas. Os contaminantes liberados não apresentam riscos apenas para o ecossistema aquático, mas desencadeiam uma cascata de efeitos que impactam diretamente a população humana que depende destes recursos (CRAWFORD et al., 2022). Assim, o tema caracteriza-se como de extrema relevância no contexto da Saúde Única, que enfatiza interconexão entre saúde humana, animal e ambiental.

Entre as consequências da exposição de organismos aquáticos a contaminantes ambientais, pode-se observar comprometimento de funções reprodutivas por diferentes mecanismos moleculares (DOMINGUES et al., 2021) e efeitos anti-androgênicos (BAUTISTA et al., 2018). Tais efeitos podem estar relacionados ao impacto sobre o gene *cftr* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), canal iônico essencial para a função espermatária normal (TEKTEMUR et al., 2021), responsável pelo transporte de Cl⁻ e fundamental em processos celulares relacionados à motilidade espermatária, incluindo capacitação, reação acrossômica e batimento flagelar (CONG et al., 2023). Nesse sentido, a redução da expressão de *cftr* está diretamente correlacionada com a diminuição da qualidade espermatária, tornando-se um alvo chave para o equilíbrio e sustentabilidade dos ecossistemas aquáticos.

O zebrafish (*Danio rerio*) é um modelo valioso e amplamente usado em estudos ecotoxicológicos, em razão de sua elevada sensibilidade a contaminantes e homologia genética com outros vertebrados, apresentando cerca de 70% de correspondência com genes humanos (XIONG et al., 2018). Nesse contexto, a avaliação de expressão de *cftr* em zebrafish é uma ferramenta para compreensão dos mecanismos de impactos na reprodução pelos poluentes encontrados nas

enchentes, podendo servir de preditor para possíveis consequências não apenas nos ecossistemas aquáticos, mas também para a saúde humana.

Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi investigar a exposição crônica à água contaminada da enchente de 2024, na alteração da expressão do gene *cftr* e correlacionar essas alterações com parâmetros reprodutivos em zebrafish machos, contribuindo para o entendimento dos impactos ecotoxicológicos de desastres ambientais no contexto da Saúde Única.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Um total de 120 zebrafish machos adultos foi dividido em dois grupos, sendo um grupo controle (CT), sem exposição à água contaminada, e outro grupo tratamento (FL) mantido em exposição à água da enchente por 14 dias. Cada tratamento contou com 3 tanques (triplicata), cada um com 20 animais. Os animais foram mantidos com fotoperíodo de 12/12horas, alimentados 3 vezes ao dia com ração comercial e *Artemia salina*, com parâmetros físico-químicos monitorados (temperatura $27,9 \pm 0,9$ °C, pH $6,9 \pm 0,2$, oxigênio dissolvido $7,9 \pm 2,4$ mg/L). A água das enchentes utilizadas neste protocolo experimental foi coletada no canal de acesso do porto do Rio Grande, entre os molhes Leste e Oeste, enquanto a pluma de sedimentação começava a se direcionar para o mar. Para isso, uma pequena expedição embarcada foi necessária para que a água pudesse ser bombeada para recipientes de 60 L e posteriormente transportada para o laboratório.

Para análise da expressão gênica, os peixes do grupo FL foram eutanasiados (CEUA 015286/2024-61) por imersão em tricáina (MS-222) na concentração de 400 mg/L. As gônadas foram dissecadas e armazenadas a -80 °C até o uso. A extração de RNA total foi realizada utilizando reagente Trizol® combinado com PureLink™ RNA Mini Kit. A qualidade do RNA foi verificada por espectrofotometria (razão $A_{260}/A_{280} \geq 2,0$) e fluorimetria com Qubit®. A síntese de cDNA foi realizada utilizando High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit com 1000 ng de RNA total por reação. A PCR quantitativa em tempo real foi conduzida no sistema QuantStudio 3 utilizando SYBR™ Green PCR Master Mix, com reações em duplicata. Os primers específicos para *cftr* foram: forward: 5'-CGGCACCTTCAGTGGTGTG-3' e reverse: 5'-GGTTTGGCGTCTCAGATGG-3'. Os genes *eef1a* e *rpl13a* foram utilizados como normalizadores. A expressão relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Para a avaliação de parâmetros reprodutivos foi realizada a avaliação visual sob microscopia óptica da motilidade espermática contabilizada através da porcentagem de espermatozoides móveis e o tempo de motilidade.

Os dados obtidos foram analisados pelo teste *t* de Student, com o intuito de comparação entre os grupos, sendo $p < 0,05$ estatisticamente significativo. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos foram uma regulação negativa do gene *cftr* no grupo FL em relação ao CT e redução da motilidade espermática, sendo 75% no grupo FL em comparação a 99% no grupo CT. A redução de 24% na motilidade espermática representa um comprometimento relevante na capacidade reprodutiva, considerando que em peixes a fertilização é externa e altamente dependente da capacidade de locomoção dos espermatozoides para alcançar e fertilizar o óvulo no ambiente aquático. Assim, uma redução de motilidade significa um comprometimento direto do sucesso reprodutivo.

Estes achados estão diretamente correlacionados e podem ser associados, já que *cftr* é essencial para fertilização, funcionando como canal iônico que transporta principalmente Cl^- , expresso tanto na cabeça quanto na cauda dos espermatozoides (TEKTEMUR et al., 2021). Um efeito negativo na expressão do gene, é capaz de gerar um mau funcionamento dos canais de Cl^- , fundamentais para manter o equilíbrio osmótico e iônico necessário para o batimento flagelar eficiente dos espermatozoides. A disfunção desses canais resulta em comprometimento da capacidade de fertilização, impactando diretamente a sustentabilidade das populações aquáticas.

A supressão da expressão gênica observada, demonstra que a contaminação da bacia hidrográfica da Laguna dos Patos pode ter consequências crônicas e duradouras nas populações de peixes, dando indícios de possíveis respostas em outras espécies de vertebrados. Os resultados evidenciam sérios efeitos sobre a ecologia e a saúde única das regiões acometidas por enchentes, indicando a importância de pesquisas contínuas, suporte adequado, investimentos e maior atenção governamental.

4. CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu concluir que a exposição crônica a águas contaminadas das enchentes de maio de 2024, desempenha um fator de impacto reprodutivo em machos da espécie zebrafish. Além disso, evidenciou o gene *cftr* como biomarcador molecular sensível para avaliação de impactos reprodutivos de contaminantes ambientais e melhor elucidou uma relação causal entre alteração genética e comprometimento reprodutivo, assim como possíveis vias moleculares fundamentais na reprodução de peixes do sexo masculino. Esses resultados fornecem uma base científica para a necessidade de monitoramento ambiental e avaliação de riscos ecotoxicológicos em ecossistemas impactados por eventos climáticos extremos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUTISTA, F.E.A.; VARELA JUNIOR, A.S.; CORCINI, C.D.; et al. The herbicide atrazine affects sperm quality and the expression of antioxidant and spermatogenesis genes in zebrafish testes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, Amsterdam, v.206-207, p.17-22, 2018.

BRASIL DE FATO. **Enchentes já impactam 461 dos 497 municípios do Rio Grande do Sul**. Brasil de Fato, São Paulo, 16 maio 2024. Acessado em 28 ago. 2025. Online. Disponível em: <https://www.brasildefato.com.br/2024/05/16/enchentes-ja-impactam-461-dos-497-municípios-do-rio-grande-do-sul>.

CONG, S.; ZHANG, J.; PAN, F.; et al. Research progress on ion channels and their molecular regulatory mechanisms in the human sperm flagellum. **The FASEB Journal**, Bethesda, v.37, p.e23052, 2023.

CRAWFORD, S.E.; BRINKMANN, M.; OUELLET, J.D.; et al. Remobilization of pollutants during extreme flood events poses severe risks to human and

environmental health. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.421, p.126691, 2022.

DOMINGUES, W.B.; SILVEIRA, T.L.R.; NUNES, L.S.; et al. GH Overexpression Alters Spermatogenic Cells MicroRNAome Profile in Transgenic Zebrafish. **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v.12, p.704778, 2021.

TEKTEMUR, A.; ETEM ÖNALAN, E.; KAYA TEKTEMUR, N.; et al. Carbamazepine-induced sperm disorders can be associated with the altered expressions of testicular KCNJ11/miR-let-7a and spermatozoal CFTR/miR-27a. **Andrologia**, Berlin, v.53, p.e13954, 2021.

XIONG, S.; MA, W.; JING, J.; et al. An miR-200 Cluster on Chromosome 23 Regulates Sperm Motility in Zebrafish. **Endocrinology**, Washington, v.159, n.5, p.1982-1991, 2018.