

LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DO ELEMENTO TRANSPONÍVEL *Rex3* EM *Colossoma macropomum* (CHARACIFORMES, SERRASALMIDAE) SUBMETIDOS A CENÁRIOS DE MUDANÇAS CLIMÁTICAS

Alex Matheus Viana FERREIRA¹

Leila Braga RIBEIRO²

Eliana FELDBERG³

¹Bolsista Iniciação Científica INPA-PIBIC/CNPq;

²FIXAM/FAPEAM; ³CBIO/INPA.

INTRODUÇÃO

Elementos transponíveis (ET) são sequências de DNA repetitivo presentes em grande quantidade no genoma de eucariotos e que possuem a capacidade de se integrar em diferentes porções do genoma, podendo mobilizar outras sequências próximas, nesse processo de deslocamento (Biémont e Vieira 2006). A mobilização de ET pode ser controlada por sinais celulares, choques térmicos, dentre outros estresses ambientais (Almeida e Carareto 2005; Burt e Trivers 2006). Como forma de evitar possíveis efeitos prejudiciais de ET ativos, o genoma do hospedeiro, em sua evolução, desenvolve mecanismos que suprimem sua atividade, como por exemplo, modificações de histonas, metilação do DNA e heterocromatinização (Okamoto e Hirohiko 2001; Mansour 2007).

Nesse contexto, a análise do comportamento de ET frente a variações térmicas é de grande importância na compreensão dos mecanismos relacionados à dispersão dos mesmos nos genomas. Diversos estudos apontam para alterações nos mecanismos de transcrição e transposição de ET, seja com a diminuição de temperatura (Ivashuta *et al.* 2002; Hashida *et al.* 2003; 2006; Fujino *et al.* 2011; Laudencia-Chinguanco e Fowler 2012), seja pelo aumento da mesma, como observado no elemento P de *Drosophila* (Chakrani *et al.* 1993; Kaminker *et al.* 2002).

Com relação à variação de temperatura, estudos acerca de mudanças climáticas causadas pelo aumento da emissão de gases de efeito estufa e aerossóis estimam um aumento de 0,2 °C para as próximas duas décadas, segundo o Relatório Especial sobre Cenários de Emissões (RECE). Além disso, mesmo que as taxas de emissão de gases de efeito estufa e aerossóis permanecessem constantes ainda assim seria esperado um aumento adicional de 0,1 °C por década (IPCC 2014). Tais variações térmicas podem, portanto, atuar como fator estressante e promover a dispersão de ET em genomas hospedeiros.

Tal relação já foi relatada em peixes por meio do mapeamento cromossômico de ET. Dentre os ETs estudados nesse grupo destacam-se os retroelementos da família *Rex*. Nesta família de ET, os mais estudados em peixes são os *Rex1*, *Rex3* e *Rex6*, isolados primeiramente em *Xiphophorus maculatus* (Volf *et al.* 1999). Valente *et al.* (2011) realizaram o mapeamento cromossômico dos retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em oito espécies de ciclídeos e perceberam uma deposição desses elementos na região pericentromérica dos cromossomos, coincidentes com heterocromatina. Outros trabalhos também têm mostrado a preferência desses retroelementos pelas regiões heterocromáticas, o que pode estar relacionado ao fato que essas regiões, normalmente, acumulam mais mutações sem sofrerem maiores consequências. A alteração na localização cromossômica de elementos transponíveis pertencentes à família *Rex* (*Rex1* e *Rex6*) foi observada em exemplares de *Colossoma macropomum* (tambaqui) aclimatados a temperaturas inferiores a 23 °C, bem

como o surgimento de blocos heterocromáticos nesses indivíduos (Ribeiro 2013). Tais observações mostram que estudos relacionando a presença de ET e heterocromatinização são importantes para o entendimento de mecanismos de funcionalidade genômica, em diferentes espécies.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi o mapeamento cromossômico do ET *Rex3*, em tabaquis submetidos aos cenários de aquecimento global, visando caracterizar a dispersão desse elemento na espécie e correlacionar sua dispersão cromossômica com padrões de heterocromatina, frente às variações ambientais.

MATERIAL E MÉTODOS

Sessenta (60) tabaquis juvenis foram transportados da Fazenda Santo Antônio (Rio Preto da Eva – AM) para o Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), onde foram divididos em grupos de 15 indivíduos, sendo cada grupo aclimatado em uma sala do microcosmos (estrutura que simula cenários de mudanças climáticas conforme o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas – IPCC). A primeira sala simulava as condições de temperatura daquele dia, por meio de um sensor localizado em uma área de mata do INPA; a segunda sala tinha um aumento de 2 °C em relação à primeira; na terceira a temperatura aumentava 2,4 °C em relação à primeira; e na quarta, esse aumento era de 4 °C em comparação à primeira. Após 45 dias, os animais foram anestesiados e sacrificados para a obtenção das preparações cromossômicas, segundo metodologia descrita por Bertollo *et al.* (1978). As preparações cromossômicas obtidas foram utilizadas para preparação de lâminas para visualização dos cromossomos metafásicos em microscópio óptico. A detecção dos blocos heterocromáticos foi feita segundo Sumner (1972), com algumas modificações. Para extração do DNA foi retirada uma amostra de tecido muscular e seguiu-se o protocolo de extração descrito por Sambrook *et al.* (1989), com algumas modificações. O elemento transponível *Rex3* foi amplificado por meio da técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) em termociclador com os seguintes *primers*: RTX3-F3 (5'-CGG TGA YAA AGG GCA GCC CTG-3') e RTX3-R3 (5'-TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT-3') (Volf *et al.* 1999).

Após a confirmação da sequência de interesse, os produtos de PCR foram marcados com Digoxigenina, via reação de *Nick Translation*, de acordo com as orientações do fabricante (Roche) para a obtenção das sondas. Posteriormente, foi realizada a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), descrita por Pinkel *et al.* (1986).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os indivíduos analisados apresentaram $2n=54$ cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos, o mesmo já descrito para *C. macropomum* por Nakayama *et al.* (2012) e Ribeiro *et al.* (2014). Entretanto, a localização de blocos heterocromáticos pelo bandeamento C evidenciou algumas variações cariotípicas entre os animais analisados. Nos animais mantidos nas salas 1, 2 e 3 a distribuição dos blocos heterocromáticos deu-se preferencialmente nas regiões centroméricas, com marcações mais conspícuas em alguns pares (Figura 1 a, b, c). Já, nos animais aclimatados na sala 4 observou-se um ligeiro aumento de blocos heterocromáticos, pois além das marcações centroméricas, blocos terminais também foram observados (Figura 1 d).

Embora já tenha sido descrito para o tabaqui blocos heterocromáticos marcadores em alguns cromossomos (Almeida-Toledo *et al.* 1987), isso não foi observado no presente trabalho. Quando comparamos indivíduos dessa espécie oriundos da região sudeste com os indivíduos da região amazônica (de criadouro e ambientes naturais), verifica-se uma menor quantidade de heterocromatina, com distribuição predominantemente em

porções centroméricas nos indivíduos da região amazônica (Ribeiro *et al.* 2014; presente trabalho). Porém, heterocromatinização pode ser vista como resultado de processos epigenético, em resposta a situações de estresse. Respostas epigenéticas, envolvendo mudanças na estrutura da cromatina, são fortemente influenciadas pelo ambiente, ocorrendo sem que haja alteração na sequência de DNA (Whitelaw e Whitelaw 2008). A percepção da situação de estresse ambiental pelo organismo pode levar a alterações fisiológicas rápidas, para que haja adaptação ao ambiente e alteração no controle da expressão gênica. Os resultados observados para o tambaqui, nas diferentes condições de aclimação, corroboram esta ideia, uma vez que os animais submetidos ao cenário com aumento de 4 °C apresentaram mais blocos de heterocromatina, os quais não foram observados nos indivíduos submetidos às demais condições.

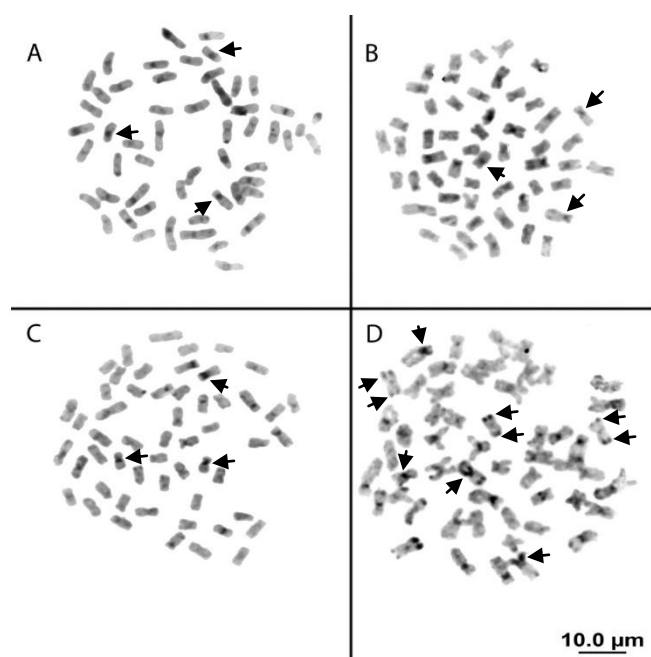


Figura 1. Metáfases de *Colossoma macropomum*, em banda C, submetidos às diferentes condições das salas do microcosmos: a) temperatura do dia (X); b) temperatura do dia com um aumento de 2 °C (X+2); c) temperatura do dia com um aumento de 2,4 °C (X+2,4); d) temperatura do dia com um aumento de 4 °C (X+4). As setas indicam os blocos heterocromáticos.

Processo epigenético semelhante já foi observado em tambaquis submetidos a temperaturas inferiores, 23 °C (Ribeiro 2013), onde estes animais apresentaram também uma heterocromatinização do genoma. A heterocromatinização verificada no presente trabalho também pode ser considerada uma resposta epigenética, mas ao aumento de temperatura, dando assim uma resposta adaptativa rápida à condição de estresse.

Com relação ao mapeamento do retroelemento *Rex3*, marcações dispersas foram observadas em todos os indivíduos analisados, com localização em regiões heterocromáticas e eucromáticas, como já descrito para esta espécie e outras da ordem Characiformes (Ribeiro 2013). Diferenças na dispersão dessas sequências e associação preferencial com heterocromatina não foram observadas entre os indivíduos aclimatados em diferentes condições. Quando comparamos a localização do *Rex3* do presente estudo, com o já descrito para a espécie em situações de estresse térmico (Ribeiro 2013), observamos que o aumento significativo de blocos

heterocromáticos e de sítios de *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* ocorrem apenas em situações onde o estresse térmico é constante e com temperaturas fixas. Isso é justificado pela presença de mecanismos celulares que visam reprimir a dispersão excessiva de sequências móveis, uma vez que essas sequências quando transpostas em porções gênicas podem ativar e/ou inativar genes de maneira não usual, e causar danos ao organismo.

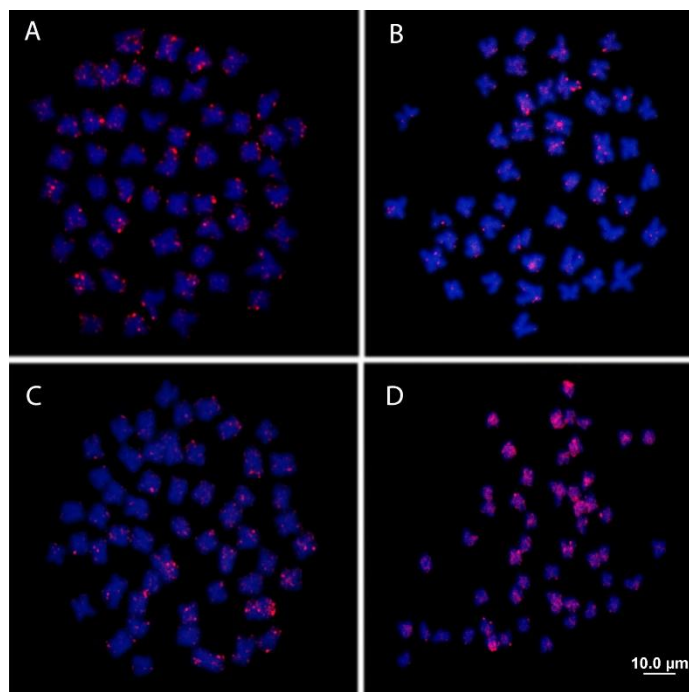


Figura 2 Metáfases de *Colossoma macropomum*, *Rex3* em FISH, submetidas às condições das salas do microcosmos: a) temperatura do dia (X); b) temperatura do dia com um aumento de 2 °C (X+2); c) temperatura do dia com um aumento de 2,4 °C (X+2,4); d) temperatura do dia com um aumento de 4 °C (X+4). Marcações em vermelho indicam a localização cromossômica do elemento transponível *Rex3*.

As variações ambientais simuladas no microcosmos, por serem mais sutis e variáveis, provavelmente não geraram um estresse térmico suficiente para que os elementos móveis tivessem sua transposição ativada e não reparada por mecanismos celulares. Isso sugere que, em cenários de mudanças climáticas, os retroelementos *Rex3* não têm sua dispersão aumentada no genoma do tambaqui. Entretanto, o aumento de 4 °C evidencia o início de um processo de heterocromatinização, que pode influenciar diretamente na expressão gênica, causando inativação de genes, como parte de um processo adaptativo para a nova condição climática.

CONCLUSÃO

Com base no exposto, podemos concluir que dentre os cenários de mudanças climáticas testados, apenas o que propõe um aumento de 4 °C na temperatura é capaz de gerar alterações no genoma do tambaqui, com aumento da heterocromatina. Elementos transponíveis, embora respondam a estresses ambientais, ainda podem ter sua dispersão pelo genoma do tambaqui controlada, evitando assim, alterações na expressão de sequências pela inserção de elementos móveis em porções gênicas.

REFERÊNCIAS

- Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F.; Toledo-Filho, S.A.; Bernardino, G.; Ferrari, V.A.; Alcântara, R.C.F. 1987. Cytogenetic studies in *Colossoma mitrei*, *C. macropomum* and their interspecific hybrid. In: *Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture*, Bordeaux, France, pp.189-195.
- Almeida, L.M.; Carareto, C.M.A. 2005. Origem, proliferação e extinção de elementos transponíveis: qual seria a importância da transferência horizontal na manutenção deste ciclo? *Série Monografias SBG*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto. 43p.
- Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S.; Moreira-Filho, O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics*, 7: 103-120.
- Biémont, C.; Vieira, C. 2006. Junk DNA as an evolutionary force. *Nature*, 443: 521-524.
- Burt, A.; Trivers, R. 2006. *Genes in conflict: the biology of selfish genetic elements*. Cambridge: Harvard University Press, p. 228-300.
- Chakrani, F.; Capy, P.; David, J.R. 1993. Development temperature and somatic excision rate of marine transposable element in three natural populations of *Drosophila simulans*. *Genetics Selection Evolution*, 25: 121-132.
- Fujino, K.; Hashida, S.N.; Ogawa, T.; Natsume, T.; Uchiyama, T.; Mikami, T.; Kishima, Y. 2011. Temperature controls nuclear import of Tam3 transposase in *Antirrhinum*. *The Journal Plant*, 65: 146-155.
- Hashida, S.N.; Kitamura, K.; Mikami, T.; Kishima, Y. 2003. Temperature shift coordinately changes the activity and the methylation state of transposon Tam3 in *Antirrhinum majus*. *Plant Physiology*, 32: 1207-1216.
- Hashida, S.N.; Uchiyama, T.; Martin, C.; Kishima, Y.; Sano, Y.; Mikami, T. 2006. The temperature-dependent change in methylation of the *Antirrhinum* transposon Tam3 is controlled by the activity of its transposase. *The Plant Cell*, 18: 104-118.
- IPCC. 2014. *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp.
- Ivashuta, S.; Nawnkina, M.; Gau, M.; Uchiyama, K.; Isobe, S.; Mizukami, Y.; Shimamoto, Y. 2002. Genotype dependent transcriptional activation of novel repetitive elements during cold acclimation of alfafa (*Medicago sativa*). *The plant journal*, 31(5): 615-627.
- Kaminker, J.S.; Bergman, C.M.; Kronmiller, B.; Carlson, L.; Sviskas, R.; Patel, S.; Frise, E.; Wheeler, D.A.; Lewis, S.E.; Rubin, G.M. et al. 2002. The transposable elements of *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective. *Genome Biology*, 3: 12.
- Laudencia-Chingcuanco, D.; Fower, D.B. 2012. Genotype dependent bursts of transposable element expression in crowns of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) during cold acclimation. *Comparative and Functional Genomics*, Doi: 10.1155/2012/2325230.
- Mansour, A. 2007. Epigenetic activation of genomic retrotransposons. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 6(2): 99-107.
- Nakayama, C.M.; Feldberg, E.; Bertollo, L.A.C. 2012. Karyotype differentiation and cytotaxonomic considerations in species of Serrasalminidae (Characiformes) from the Amazon basin. *Neotropical Ichthyology*, 10(1): 53-58.

- Okamoto, H.; Hirohiko, H. 2001. Silencing of transposable elements in plants. *Trends in Plant Science*, 6(11): 527-534.
- Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83: 2934-2938.
- Ribeiro, L.B. 2013. *Mapeamento físico cromossômico de elementos repetitivos em Colossoma macropomum (Characiformes, Serrasalmidae) associado à piscicultura*. Tese de doutorado. INPA/PPGGCBEV.
- Ribeiro, L.B.; Matoso, D.A.; Feldberg, E. 2014. Chromosome mapping of repetitive sequences in four serrasalmid species (Serrasalmidae, Characiformes). *Genetics and Molecular Biology*, 37(1): 46-53.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Springs Harbor Laboratory Press, NY.
- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.
- Valente, G.T.; Mazzuchelli, J.; Ferreira, I.A.; Poletto, A.B.; Fantinatti, B.E.A.; Martins, C. 2011. Cytogenetic mapping of the retroelements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* among cichlid fish: new insights on the chromosomal distribution of transposable elements. *Cytogenetics Genome Research*, 133: 34-42.
- Volff, J.N.; Korting, C.; Sweeney, K.; Scharl, M. 1999. The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 1427-1438.
- Whitelaw, N.C.; Whitelaw, E. 2008. Transgene rational epigenetic inheritance in health and disease. *Current Opinion in Genetics and Development*, 8: 273-279.