

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E
BIOLOGIA EVOLUTIVA – PPG GCBE_v

MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DE ELEMENTOS RETROTRANSPONÍVEIS
***REX1*, *REX3* E *REX6* E DETECÇÃO DA HETEROCROMATINA EM TAMBAQUI**
(*Colossoma macropomum*) EXPOSTOS AO ANTIPARASITÁRIO TRICLORFON

MARIA DOS SANTOS COSTA

MANAUS, AMAZONAS

JUNHO, 2019

MARIA DOS SANTOS COSTA

**MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DE ELEMENTOS RETROTRANSPONÍVEIS
REX1, REX3 E REX6 E DETECÇÃO DA HETEROCROMATINA EM TAMBAQUI
(*Colossoma macropomum*) EXPOSTOS AO ANTIPARASITÁRIO TRICLORFON**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

ORIENTADORA: DANIELE APARECIDA MATOSO, Dr^a - UFAM

Financiamento

INCT ADAPTA/CNPq/FAPEAM (fase II) - Centro de Estudos de Adaptações da Biota Aquática da Amazônia – ADAPTA II

MANAUS, AMAZONAS

JUNHO, 2019

Ficha Catalográfica

Costa, Maria dos Santos

Mapeamento cromossômico de elementos retrotransponíveis *Rex1*, *Rex3*, e *Rex6* e detecção da heterocromatina em tambaqui (*Colossoma macropomum*) expostos ao antiparasitário Triclorfon / Maria dos Santos Costa. --
- Manaus: [s.n.], 2019.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2019.

Orientador: Daniele Aparecida Matoso

Área de concentração: Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

1. Organoclorofosforados. 2. Elementos repetitivos. 3. Heterocromatinização. 4 . FISH. I. Título

Sinopse: Indivíduos de tambaqui (*Colossoma macropomum*), após serem expostos ao antiparasitário Triclorfon foram submetidos a técnicas de citogenética clássica (Bandeamento C) e molecular (Hibridização fluorescente *in situ*), observou-se que os retroelementos *Rex1*, *Rex3*, *Rex6* tiveram uma distribuição dispersa diferenciada, onde os sítios de *Rex1* e *Rex6* mostraram um perfil de distribuição mais disperso e o *Rex3* apresentou aumento na intensidade de marcações e no padrão de distribuição, além da associação com blocos heterocromáticos de forma proeminente, possivelmente mediada por mecanismos epigenéticos adaptativos voltados a reprimir a mobilização desses retroelementos induzidas pelo antiparasitário Triclorfon.

Palavras-chave: Organoclorofosforados, Elementos repetitivos, Heterocromatinização, FISH.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende”.

(Leonardo Da Vinci)

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço ao meu maravilhoso Deus, que a todo o momento esteve comigo guiando meus caminhos e me concedendo forças.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), por ter dado suporte para o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo financiamento do projeto, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Ao PPG GCBEv e seu corpo administrativo coordenadora Dr^a Jacqueline da Silva Batista, Elci e colaboradores.

À minha orientadora, a Prof^a Dra. Daniele Aparecida Matoso por me orientar com excelência, sempre me incentivando a adquirir novos conhecimentos, convertendo assim cada desafio em novas formas de aprendizagem, muito obrigada pela confiança que depositou em mim e por toda solicitude em inúmeras vezes que precisei.

À Prof^a Dra. Eliana Feldberg por todo apoio desde o início e também por ter cedido toda a estrutura do Laboratório de Genética Animal (LGA) e também a todos seus alunos que sempre estavam dispostos a ajudar no que fosse necessário, em especial ao Ramon Favarato por todo suporte necessário na realização da FISH, obrigada por compartilhar seus conhecimentos da melhor forma possível, agradeço também a Simone Soares por sempre me orientar metodicamente me fornecendo muito aprendizado nas técnicas de citogenética, e no que fosse necessário, sempre estando ao meu lado até mesmo na véspera de Natal analisando lâminas comigo. Ao colega de turma Alex Matheus por sempre esclarecer dúvidas com relação às técnicas citogenéticas, aprendi muito com todos vocês.

A todos os integrantes do Laboratório de Biotecnologia e Citogenômica Animal da (UFAM), equipe alfa (Hallana, Fabricio, Igor, Ana Paula, Eduardo, Luana, Pedro, Tereza e Letícia) por todo companheirismo e apoio na realização do experimento.

A todos que fazem parte Laboratório Úmido de Parasitologia, Fisiologia e Genética de Animais Aquáticos (UFAM), equipe Optimus prime (Jhonatan, André, Raoni, entre outros), por sempre estarem dispostos a ajudar no que fosse necessário. Agradeço também aos

professores Dr. Wallice Duncan e Dra. Ana Lúcia por todo suporte necessário na realização do experimento da CL_{50-96h}.

Ao meu esposo Fábio Junior por todo o incentivo e companheirismo e por sempre me ajudar em tudo que precisei.

Aos meus pais Raymundo e Fátima, que mesmo longe me proporcionaram todo apoio necessário, sempre sendo meus motivos de alegria, me fazendo querer seguir em frente sempre.

À minha querida irmã Misma, esposo Davi e filhas por todo suporte concedido e também a todos meus irmãos por sempre torcerem por mim em tudo.

Resumo

Os genomas dos organismos eucariotos são constituídos por uma grande fração de DNA repetitivo abrangendo os elementos transponíveis (ETs). Os ETs consistem em entidades estruturais e reguladoras que aliadas a alterações epigenéticas podem dirigir a adaptação e evolução fornecendo fenótipos adaptativos, com capacidade de responder de forma distinta de acordo com desafios específicos de estresse. Os retroelementos do tipo *Rex* correspondem as classes de ETs mais conhecidas e com maior distribuição em peixes, desempenhando um papel importante na dinâmica evolutiva desse grupo e amplamente distribuídos no seu genoma. Com intuito de analisar os efeitos do antiparasitário Triclorfon na mobilização de elementos retrotransponíveis do tipo *Rex* em cromossomos mitóticos de tambaqui (*Colossoma macropomum*), realizou-se o mapeamento cromossômico de elementos retrotransponíveis *Rex1*, *Rex3*, *Rex6* e detecção da heterocromatina constitutiva. Os exemplares de tambaqui foram aclimatados durante 40 dias, posteriormente a ($CL_{50-96h} = 0,870$ mg/L) foi determinada. Neste estudo os peixes foram distribuídos e foram estabelecidas duas concentrações a serem utilizadas: C1-30% e C2-50% do valor da CL_{50-96h} , foram utilizados para esse experimento 9 tanques de polietileno com volume de água controlados de 60 litros contendo 6 peixes em cada tanque. O tambaqui apresentou $2n = 54$ cromossomos (26m + 28sm) e número fundamental (NF) 108, foi evidenciada a presença predominante de blocos heterocromáticos nas porções centroméricas de todos os pares de cromossomos mitóticos do grupo controle e presença de blocos heterocromáticos mais conspícuos com marcações biteloméricas e marcações na região terminal na condição de maior concentração de Triclorfon. A distribuição dos retroelementos *Rex1*, *Rex3*, *Rex6* mostraram-se dispersa e diferenciada, os sítios de *Rex1* e *Rex6* exibiram um perfil de distribuição mais disperso enquanto o *Rex3* apresentou aumento na intensidade de marcações e no padrão de distribuição, além da associação com blocos heterocromáticos de forma proeminente em (C2-72h), possivelmente mediadas por mecanismos epigenéticos adaptativos voltados a reprimir a mobilização desses retroelementos induzidas pela exposição ao Triclorfon mais evidente nos exemplares expostos à maior concentração e ao maior período de exposição, podendo refletir na diversidade genética necessária para que essas espécies consigam se adaptar às mudanças ambientais.

Palavras-chave: Organoclorofosforados, Elementos repetitivos, Heterocromatinização, FISH.

Abstract

The genomes of eukaryotic organisms are constituted by a large fraction of repetitive DNA covering the transposable elements (TEs). TEs consist of structural and regulatory entities that, combined with epigenetic changes, can direct adaptation and evolution by providing adaptive phenotypes with the capacity to respond differently to specific stress challenges. The Rex-type retroelements correspond to the classes of TEs that are better known and with greater distribution in fish, playing an important role in the evolutionary dynamics of this group and widely distributed in their genome. In order to analyze the effects of Triclorfon antiparasitic on the mobilization of retranslatable elements of the Rex type in tambaqui mitotic chromosomes (*Colossoma macropomum*), the chromosome mapping of retrotransposable elements *Rex1*, *Rex3*, *Rex6* and detection of constitutive heterochromatin was performed. Tambaqui specimens were acclimatized for 40 days, after which ($CL_{50-96h} = 0.870 \text{ mg / L}$) was determined. In this study the fish were distributed in two concentrations to be used: C1-30% and C2-50% of the value of CL_{50-96h} , were used for this experiment 9 polyethylene tanks with controlled water volume of 60 liters containing 6 fish in each tank. The tambaqui presented $2n = 54$ chromosomes (26m + 28sm) and the fundamental number (NF) 108, the predominant presence of heterochromatic blocks in the centromeric portions of all pairs of mitotic chromosomes of the control group and the presence of more conspicuous heterochromatic blocks with markings bitelomeric, marking in the terminal region in the condition of higher concentration of Trichlorfon. The distribution of the *Rex1*, *Rex3*, *Rex6* retroelements were dispersed and differentiated, the *Rex1* and *Rex6* sites exhibited a more dispersed distribution profile while *Rex3* showed increased mark intensity and distribution pattern, as well as association with heterochromatic blocks (C2-72h), possibly mediated by adaptive epigenetic mechanisms aimed at suppressing the mobilization of these retroelements induced by exposure to Trichlorfon more evident in the specimens exposed to the higher concentration and the longer period of exposure, being able to reflect on the genetic diversity necessary for that these species can adapt to environmental changes.

Key words: Organochlorophosphates, Repetitive elements, Heterochromatinization, FISH.

Sumário

1. Introdução	1
1.1 Considerações gerais sobre o uso do Triclorfon na piscicultura	1
1.2 O cultivo do tabaqui	3
1.3 Caracterização dos Retroelementos transponíveis <i>Rex</i>	4
2. Objetivos	7
2.1 Geral:	7
2.2 Específicos:	7
3. Material e métodos	8
3.1 Delineamento experimental: aquisição, aclimação dos espécimes e coleta de tecido	8
3.2 Obtenção de cromossomos mitóticos	11
3.4 Detecção da Heterocromatina Constitutiva (Técnica de Bandeamento C)	12
3.5 Extração de DNA total	13
3.7 Hibridização Fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	15
4. Resultados	16
5. Discussão	26
6. Conclusão	31
7. Referências Bibliográficas	33

Lista de Figuras

Figura 1. Taxa de sobrevivência de juvenis de <i>Colossoma macropomum</i> após 96 horas de exposição às concentrações nominais do antiparasitário Triclorfon (Silva et al. 2019, no prelo).....	10
Figura 2. Montagem do experimento, pesagem e medição dos espécimes.....	11
Figura 3. Cariótipos de <i>C. macropomum</i> submetidos ao Bandejamento C para evidenciar padrão o de distribuição da heterocromatina em indivíduos: a) Controle; b) Concentração 1-48h; c) Concentração 2-48h; d) Concentração 2-72h; e) Concentração 2-96h.....	19
Figura 4. Mapeamento físico cromossômico do retroelemento <i>Rex 1</i> (sinal vermelho) em <i>C. macropomum</i> : a) Controle; b) Concentração 1- 48h; c) Concentração 1-72h; d) Concentração 2-48h; e) Concentração 2-72h; f) Concentração 2-96h.	23
Figura 5. Mapeamento físico cromossômico do retroelemento <i>Rex 3</i> (sinal vermelho) em <i>C. macropomum</i> : a) Controle; b) Concentração 1-48h; c) Concentração 1-72h; d) Concentração 2-48h; e) Concentração 2-72h; f) Concentração 2-96h.	24
Figura 6. Mapeamento físico cromossômico do retroelemento <i>Rex 6</i> (sinal vermelho) em <i>C. macropomum</i> : a) Controle; b) Concentração 1-48h; c) Concentração 1-72h; d) Concentração 2-48h; e) Concentração 2-72h; f) Concentração 2-96h.....	25

Lista de Tabela

Tabela 1. Variação dos parâmetros físicos e químicos da água ao longo dos experimentos. Os dados estão como média diária de todos os tanques experimentais por concentração de Triclorfon na água (Silva et al. 2019, no prelo).....	10
---	----

Lista de Abreviaturas

2n – Número diploide

Ba(OH)₂ – Hidróxido de Bário

Bandamento C – Técnica de detecção da heterocromatina constitutiva

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol

DNA_r – Ácido desoxirribonucleico

ribossomal

dNTP – Desoxirribonucleotídeos

trifosfatados

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

FISH – Hibridação In Situ Fluorescente

FITC – Fluoresceína isotiocianato
(fluorescein isothiocyanate)

HCl – Ácido Clorídrico

KCl – Cloreto de Potássio

LTRs – Repetição terminal longa

LINEs – Elementos longos interespaçados

m – Metacêntrico

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

mL – Mililitro

mM – Milimolar

NaCl – Cloreto de Sódio

NF – Número Fundamental

Não-LTRs – Repetição terminal curta

NFDM – Non-fat Dried Milk (Leite em pó desnatado)

ng – Nanograma

°C – Graus Celsius

CL_{50-96h} – Concentração letal mediana

pb – Pares de base

PBS – Buffer Fosfato Salino (Tampão Fosfato-Salino)

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Potencial de Hidrogênio

Rex – Retroelemento isolado primariamente de *Xiphophorus*

RPM – Rotações Por Minuto

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

SINEs – Elementos curtos interespaçados

sm – Submetacêntrico

SSC – Solução Salina Citrato de Sódio

μl – Microlítros

μm – Micrometro

Introdução

1.1 Considerações gerais sobre o uso do Triclorfon na piscicultura

Os pesticidas são utilizados mundialmente no controle de pragas tanto na agricultura quanto na piscicultura (Jordaan et al. 2013). O Brasil é classificado como maior consumidor de pesticidas, abrangendo cerca de 20% de consumo em escala mundial (Albuquerque et al. 2016). Sendo que os pesticidas organoclorofosforados são os mais utilizados (Boulanouar et al. 2018), pois são considerados menos prejudiciais ao ambiente, e permanecem por menos tempo no meio (Kubitza e Kubitza, 1998; Varó et al. 2000; Pehkonen e Zhang, 2002). Apesar disso a absorção desses compostos organoclorofosforados através da água e alimentos contaminados pode ser altamente tóxico para os seres humanos e outras espécies como peixes e outros organismos aquáticos (Mataqueiro 2006, Mladenović et al. 2018), podendo resultar na degradação do ambiente e conseqüentemente comprometer a saúde e os ecossistemas (Veiga et al. 2006).

O organoclorofosforado Triclorfon (dimetil-hidroxi-2,2,2,-triclóroel), conhecido como Dipterex 500[®], Tugon ou Neguvon é amplamente utilizado como antiparasitário na piscicultura (Chang et al. 2013) e altas concentrações desse composto pode ocasionar na inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), promovendo o acúmulo de acetilcolina (ACh) nas sinapses nervosas e conseqüentemente prejudicando a função nervosa (Fernandes et al. 2015) por causar uma interferência irreversível na função do nervo colinérgico. Nas placas motoras doses sub-letais deste tipo de composto podem resultar em prejuízos fisiológicos, comportamentais e ecológicos de grande relevância (Herbert et al. 2019). O Triclorfon também pode induzir o estresse oxidativo, levando à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e alterações nos sistemas de enzimas antioxidantes (Lu et al. 2018).

Vários protocolos têm sido utilizados no tratamento de uma série de parasitoses responsáveis por inúmeras doenças em peixes, uma das alternativas mais utilizadas consiste em banhos terapêuticos (Fouz et al. 2001). Para o tratamento considera-se dosagem/tempo de duração, visto que banhos prolongados combinados com uma alta dosagem de Triclorfon podem ocasionar a mortalidade dos animais (Flores-Nava e Vizcarra-Quiroz, 1988).

Na Resolução número 20 realizada pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) em 18 de julho de 1986, foi estabelecido a permissão de 1,0 mg/L, de organoclorofosforados em água doce, porém, os piscicultores lançam na água doses variadas.

Para os banhos de imersão as doses variam de 0,13 mg/L a 25 g/L de Triclorfon (Kubitza e Kubitza, 1998).

O uso descontrolado de Triclorfon em fazendas de pisciculturas faz com que este composto seja hidrolisado a diclorvós metabólito, associado à toxicidade mais elevada desse composto (Yoshimura e Endoh 2005), como observado em vários estudos.

Rauco (2002) analisou a toxicidade aguda (CE50-48h) do Triclorfon em *Daphnia similis*, *Daphnia magna* e *Daphnia laevis* na ausência e presença de sedimento, evidenciando que o Triclorfon superou o nível de toxicidade do sulfato de cobre com relação às espécies estudadas, através disso, concluiu que o sedimento diminui a biodisponibilidade do composto na água, portanto esse composto aparece com alto risco de intoxicação ambiental para as espécies em estudo.

Veiga et al. (2002) ao estudarem curimatá (*Prochilodus scrofa*), usando 0,2µg/L de Triclorfon diluídos em água, após 24 horas que os animais foram expostos notaram danos aos núcleos picnóticos, além de apresentarem focos de necrose e também um considerável decréscimo do número de eritrócitos.

Sinha et al. (2010), realizaram um estudo referente às características da expressão gênica, em pangásius (*Pangasianodon hypophthalmus*), peixe considerado potencialmente apto para a piscicultura na Ásia. Foram estudados os genes: *heat shock protein 70* (HSP70), hormônio de crescimento, acetilcolinesterase (AChE), tripsinogênio, citocromo P4501B (CYP1B) e citocromo oxidase subunidade 1 (COI), onde a quantificação e a expressão foram avaliadas a partir do fígado e das brânquias desses animais, que foram submetidos a três concentrações de Triclorfon: 0,01mg/L, 0,1mg/L e 0,5mg/L. Os resultados obtidos indicaram que nas concentrações de 0,1mg/L e 0,5mg/L, ocorreu aumento na expressão de HSP70, COI e CYP1B, todavia o AChE (hormônio de crescimento) e o tripsinogênio apresentaram diminuição significativa de expressão.

Venturini et al. (2014) avaliaram os efeitos dos banhos de imersão em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) utilizando 8µg/L de Triclorfon, neste estudo foram analisadas também a recuperação dos peixes expostos. Sendo observado a redução na atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no cérebro dos peixes após a exposição e esse decréscimo permaneceu durante o período de recuperação. No entanto no músculo, a AChE teve um decréscimo na atividade apenas após o período de recuperação dos peixes. Nesse estudo

também foi evidenciada alteração no metabolismo intermediário dos peixes relacionado a hipoglicemia, neoglicogênese e catabolismo lipídico nos animais, que se manteve até mesmo após a recuperação.

Considerando que o aparato genético de um organismo pode interagir de variadas formas com agentes genotóxicos como o antiparasitário Triclorfon, podendo afetar o metabolismo do tambaqui, sendo inclusive bioacumulado, torna-se fundamental conhecer os efeitos deste composto no genoma da espécie, com a finalidade de aperfeiçoar traços importantes do cultivo na piscicultura, como a resistência a doenças e o aumento na produção desse pescado.

1.2 O cultivo do tambaqui

O tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier 1818) é um peixe teleósteo de água doce pertencente à ordem Characiformes e a família Serrasalminidae (Géry, 1977). Consiste no segundo maior peixe de água doce da América do Sul, podendo chegar a medir 108 cm de comprimento e 40 kg de peso corporal (Froese e Pauly, 2016). Ele se alimenta principalmente de frutos e sementes e corresponde a espécie com maior importância comercial na pesca e na piscicultura da região Amazônica, sendo também a mais cultivada (Goulding e Carvalho 1982, Santos et al. 2006).

Em ambiente natural esses animais habitam normalmente lagos e rios de águas pretas, claras e brancas e são espécies endêmicas das bacias do Orinoco e Amazonas (Araújo-Lima e Goulding 1998, Soares et al. 2008). O tambaqui apresenta fisiologia robusta, sendo resistente às condições hipóxicas e ácidas características dessas regiões (Florindo 2006, Robertson et al. 2015), suporta amplas faixas temperatura ao longo da vida (Gomes et al. 2013) e mostram-se propícios a adaptações garantindo a sua sobrevivência diante de desafios ambientais (Florindo 2006).

Dados estatísticos referentes à produção de tambaqui no Brasil relatam um significativo aumento nos últimos anos. A produção total da piscicultura brasileira foi de 691.700 toneladas e a produção de tambaqui corresponde a 43,7% da produção brasileira (302.235 toneladas), sendo que a região Norte do país responde pelo maior cultivo. O município de Rio Preto da Eva (AM) é o segundo maior produtor nacional de tambaqui (IBGE, 2017).

A criação do tambaqui em sistemas de criação intensiva tem sido favorecida devido esses peixes apresentarem baixo teor de gordura, rusticidade, altas taxas de fecundidade, crescimento rápido, resistência a mudanças abruptas de pH e baixas concentrações de oxigênio dissolvido, e a capacidade de aceitar alimentos de várias fontes (Junk, 1985, Araújo-Lima e Goulding 1998, Dairiki e Silva, 2011).

Devido ser amplamente cultivado em fazendas de pisciculturas, o tambaqui desperta interesse para o desenvolvimento de estudos envolvendo fatores zootécnicos, ecológicos e genéticos (Kubitza et al. 2007, Aguiar et al. 2013, Santos et al. 2016), estudos de manejo em cativeiro (Silva et al. 2007, Gomes e Silva, 2009); análises acerca de adaptações fisiológicas (Almeida-Val et al. 1991, Matsuo e Val, 2007, Wood et al. 2018); efeitos da pesca (Silvano et al. 2009); estudos parasitológicos e reprodutivos (Araújo-Lima e Goulding 1998, Pires et al. 2018) e estudos da manipulação genética para obtenção de híbridos e poliploides (Toledo-Filho et al. 1994; Nirchio et al. 2003, Hashimoto et al. 2011).

Com relação aos aspectos citogenéticos, a caracterização citogenética de tambaqui evidenciou um cariótipo composto por $2n = 54$, sendo 13 pares de cromossomos metacêntricos e 14 pares de cromossomos submetacêntricos e número fundamental (NF) de 108 (Nakayama et al. 2012, Ribeiro et al. 2014).

Desse modo, o tambaqui representa um excelente modelo experimental, visto que grande parte das pisciculturas que respondem pela produção do tambaqui faz uso do Triclorfon para controlar a infestação de parasitas. Além disso, os retroelementos do tipo *Rex* estão presentes no genoma do tambaqui e alterações no padrão de distribuição destes retroelementos em cromossomos mitóticos, sugerem que estão relacionados à adaptação da espécie a diferentes condições de estresse.

1.3 Caracterização dos Retroelementos transponíveis *Rex*

Os genomas dos organismos eucariotos são compostos por uma parcela considerável de DNA repetitivo (Charlesworth et al. 1994, Sene et al. 2015). Os dois grandes grupos de sequências repetitivas em eucariotos envolvem repetições *em tandem* e dispersas (Charlesworth et al. 1994). Repetições *em tandem* são constituídas de sequências de DNA não codificantes repetidas uma após a outra por várias vezes, incluindo DNAs satélites (altamente repetitivas), mini e microsatélites, DNAs ribossomais e repetições simples (moderadamente

repetitivas) (Charlesworth et al. 1994, Martins 2007, Padeken et al. 2015). Repetições *em tandem* mostraram possuir um papel fundamental na expressão gênica e na montagem da heterocromatina (Kloc and Martienssen 2008, Pezer et al. 2012).

As repetições dispersas incluem os elementos transponíveis (ETs), que consistem simplesmente em sequências de DNA que têm a capacidade de se transpor, isto é, eles mudam sua localização cromossômica de uma posição para outra dentro do mesmo genoma, em uma única célula (Kidwell e Lisch 2001, Hua-Van et al. 2011). Os elementos transponíveis podem produzir grandes alterações após sua transposição em novos locais no genoma, dependendo do local de inserção e da sequência do próprio ET (Gogvadze e Buzdin 2009).

Quando o ET é inserido na região 5' de um gene, pode gerar a superexpressão do mesmo através da adição de novas regiões reguladoras, ou interromper regiões reguladoras presentes. Ele também pode promover a inativação do gene em um tecido específico, ocasionando alteração do quadro de leitura de um gene, ou ainda adicionar um *stop* códon ao ser inserido em um éxon, gerando novas variantes de *splicing* alternativo, e ativar mecanismos de silenciamento epigenético resultando na inativação de genes (Casacuberta e González 2013).

Os ETs estão organizados em duas principais classes conforme o mecanismo de transposição utilizado: os elementos de classe I (retrotransposons) se transpõem através de um intermediário de RNA, enquanto os elementos de classe II (transposons) se transpõem através de um intermediário de DNA (Jurka et al. 2007, Philippsen et al. 2016). Os retrotransposons utilizam um mecanismo de “copiar e colar” para a sua transcrição, introduzindo novas cópias em outro local no genoma. Os transposons se transpõem movendo-se para novos locais no genoma sem um intermediário de RNA, isto é, utilizando um mecanismo de “cortar e colar” (Finnegan 1989, Wicker et al. 2007, Rostant et al. 2012).

A classificação dos elementos transponíveis foi descrita da seguinte forma: a classe I compreende os retrotransposons LTR (Long Terminal Repeat) (elementos móveis semelhantes a retrovírus endógenos), e os retrotransposons não-LTR envolvendo os elementos LINES e SINES (Lerat et al. 2019). Os LINES (Long interspersed nuclear element) contêm duas ORFs (Open Reading Frames) sendo que uma dessas duas ORFs codifica para uma endonuclease (EN) que é mediadora da transposição. SINES (Short interspersed nuclear elements) não codificam proteínas necessárias para sua retrotransposição, assim, eles

precisam da Transcriptase reversa (TR) do LINE para que aconteça o processo de retrotransposição. (Carducci et al. 2018).

Os retrotransposons não-LTR, incluindo os elementos *Rex* são as classes de ETs mais conhecidas e com maior distribuição em teleósteos (Gross et al. 2009, Valente et al. 2011). Os retrotransposons *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* inicialmente descritos no genoma de peixes do gênero *Xiphophorus* por Volff et al. (1999, 2000 e 2001a) apresentam papéis importantes na dinâmica evolutiva dos peixes, revelando-se ativos na evolução desse grupo e largamente distribuídos no seu genoma.

Enquanto a estrutura dos retroelementos, o *Rex1* é constituído por uma região conservada na extremidade 3', acompanhados por repetições *em tandem* de oligonucleotídeos de tamanhos variados (Volff et al. 2000). O *Rex3* corresponde ao primeiro retrotransposon de codificação de transcriptase reversa (TR), com ampla distribuição e diferentes padrões de organização nos genomas de várias espécies de peixe (Volff et al. 1999), é o mais difundido entre os teleósteos (Volff et al. 2001a), sendo achado em espécies que divergiram há 150-200 milhões de anos (Volff et al. 1999). O *Rex3* apresenta truncamentos na extremidade 5' na maioria das cópias e uma cauda na extremidade 3', composta por repetições *em tandem* de GATG (Volff et al. 1999). O *Rex6* foi o primeiro a ser identificado em vertebrados apresentando endonuclease de restrição (Volff et al. 2001a). Apresenta-se ativo na evolução do genoma de várias espécies de peixes, passando por vários processos de retrotransposição, sendo capaz de gerar um grande número de cópias desse retroelemento na maioria das espécies (Volff et al. 2001b).

Esses retrotransposons do tipo *Rex* podem ser inseridos em DNAr, principalmente em peixes (Symonová et al. 2013), com capacidade também de se espalhar entre espécies isoladas reprodutivamente por meio de um processo mediado por vírus denominado de transferência horizontal propiciando a evolução desses retrotransposons no genoma de forma complexa (Volff et al. 2000, Volff et al. 2001, Carducci et al. 2018). Estudos relacionam a atividade desses retroelementos com a adaptação ambiental, deixando clara a sua relação com a mudança fenotípica adaptativa (Casacuberta e González 2013).

Como observado no estudo de Barbosa et al. (2014) referente a avaliação da expressão diferencial de *Rex6*, em brânquias, fígado e músculo de *Colossoma macropomum*.

Nessa análise foi evidenciado um maior nível de expressão gênica de retroelementos *Rex6* em indivíduos provenientes de água clara do que em indivíduos provenientes de água preta.

Silva et al. (2016) realizaram o mapeamento cromossômico em *Hoplosternum litoralle* em dois diferentes tipos de água, revelando que os espécimes que habitam em águas poluídas apresentam mais marcações de *Rex3* quando comparados aos provenientes de água não poluída.

Os retroelementos demonstram ter um importante papel na evolução do genoma e na adaptação do organismo a alterações ambientais (Biémont, 2010, Reilly et al. 2013). Estes retroelementos funcionam como excelentes marcadores para a evolução molecular e mapeamento físico, favorecendo no melhor entendimento acerca do papel dos elementos repetitivos na organização do genoma e na evolução dos teleósteos (Ferreira et al. 2011, Schneider et al. 2013).

2. Objetivos

2.1 Geral:

- Analisar os efeitos do antiparasitário Triclorfon na mobilização de elementos retrotransponíveis do tipo *Rex* em cromossomos mitóticos de *Colossoma macropomum* após a exposição ao antiparasitário Triclorfon.

2.2 Específicos:

- Verificar o padrão de distribuição e organização dos elementos retrotransponíveis *Rex1*, *Rex3*, *Rex6* no genoma de *Colossoma macropomum* submetidos ao antiparasitário Triclorfon e em exemplares não expostos.
- Comparar os padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva nos espécimes controle e nos espécimes submetidos ao antiparasitário Triclorfon.

3. Material e métodos

3.1 Delineamento experimental: aquisição, aclimação dos espécimes e coleta de tecido

Indivíduos juvenis de tambaqui foram selecionados na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus-AM, (2°38'57,6"S 60°3'11"W), localizada no km 38 da BR-174 . Estes peixes foram transferidos para o Laboratório Úmido de Parasitologia, Fisiologia e Genética de Animais Aquáticos sendo mantidos em caixas de polietileno à temperatura de aproximadamente (25±2°C), durante 40 dias (aclimação), período em que os animais foram monitorados para o controle de suas condições vitais. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial contendo 40% de proteína e passaram por restrição alimentar 24 horas antes do início do experimento para o esvaziamento gastrointestinal. Foram estabelecidas cinco concentrações nominais: 0,0, 0,4, 0,8, 1,6 e 3,2 mg/L de Triclorfon. Os peixes foram distribuídos em grupos de 6 exemplares para cada tanque contendo 60 litros de água. O experimento foi realizado em triplicata para cada concentração de Triclorfon (inclusive o grupo controle), com distribuição aleatória. A mortalidade dos peixes em cada concentração de Triclorfon foi registrada em 48h, 72h e 96h (Figura 1).

Neste estudo a CL_{50-96h} teve como resultado ($CL_{50-96h} = 0,870$ mg/L). A determinação da CL_{50-96h} consiste na concentração do agente tóxico que causa a mortalidade 50% dos espécimes em 96h de exposição (concentração letal mediana) e foi realizada através do teste de toxicidade aguda conforme orientações da OECD (1992).

Após o cálculo da CL_{50-96h} , iniciou-se o experimento no qual as caixas contendo os peixes foram mantidos em fotoperíodo 12:12h sob aeração constante durante as 96h de experimento. Foram avaliadas as variáveis físicas e químicas da água: temperatura, pH e oxigênio dissolvido, utilizando uma sonda multiparamétrica e um Peagâmetro. As análises da qualidade da água foram realizadas durante todo o período experimental, sendo iniciadas 2 horas após o início do experimento e repetidas a cada 24 horas. A qualidade da água manteve-se dentro dos limites considerados aceitáveis para o tambaqui apresentado na Tabela 1, (teste da CL_{50-96h} e experimento no geral apresentaram valores equivalentes de T, pH e O_2 dissolvido). Tanto o teste da CL_{50-96h} como o experimento foram conduzidos em um sistema estático sem renovação de água.

No experimento que compôs o presente estudo foram estabelecidas duas concentrações a serem utilizadas para garantir que os peixes continuassem vivos durante todo o experimento: C1 – concentração 1 com 30% do valor da CL_{50-96h} que correspondeu à 0,261

mg/L de Triclorfon adicionados à água, C2 – concentração 2 com 50% do valor da CL_{50-96h} que correspondeu à 0,435 mg/L de Triclorfon e C0 – condição controle sem adição de Triclorfon à água. Foram utilizados para esse experimento 9 tanques de polietileno com volume de água controlados de 60 litros contendo 6 peixes em cada tanque, a ordem das concentrações utilizadas em cada tanque foi estabelecida de forma aleatória. Os peixes foram coletados nos intervalos de tempo de 48 horas, 72 horas e 96 horas, com seus respectivos grupos controles (sendo coletados 2 peixes em 48hs -72hs - 96hs, (totalizando 54 exemplares- todos permaneceram vivos até a finalização do experimento).

Após a coleta, os peixes foram transferidos para o Laboratório de Biotecnologia e Citogenômica Animal da UFAM onde foram medidos: ($7,3 \pm 0,9$ cm) e pesados: ($13,6 \pm 4,3$ g), para então serem submetidos aos procedimentos experimentais citogenéticos. Todos os procedimentos descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – CEUA/UFAM sob número de protocolo 030/2018.

Figura 1. Taxa de sobrevivência de juvenis de *Colossoma macropomum* após 96 horas de exposição às concentrações nominais do antiparasitário Triclorfon (Silva et al. 2019, no prelo).

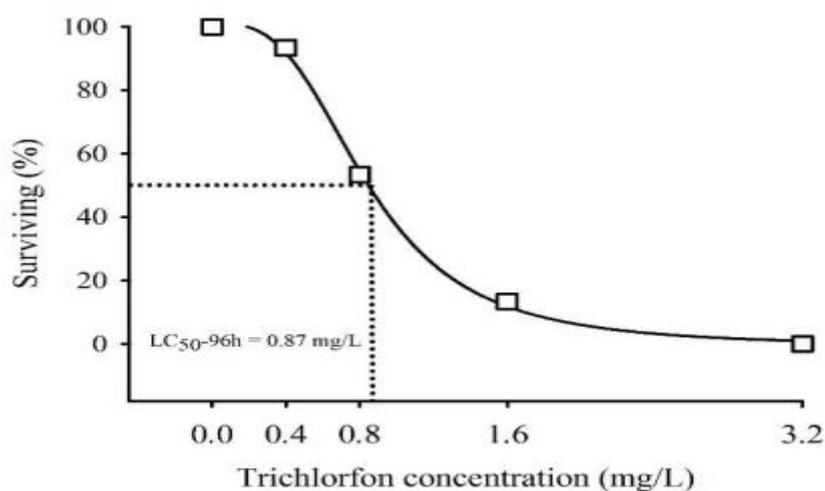


Tabela 1. Variação dos parâmetros físicos e químicos da água ao longo dos experimentos. Os dados estão como média diária de todos os tanques experimentais por concentração de Triclorfon na água (Silva et al. 2019, no prelo).

	pH	Temperatura (°C)	O2 Dissolvido (mg/L)
Concentração 0	7,2	25,4	6,5
Concentração 1	7,1	25,3	6,6
Concentração 2	6,8	25,3	6,3
Concentração 3	6,9	25,2	6
Concentração 4	6,8	25	5,6



Figura 2- Montagem do experimento, pesagem e medição dos espécimes.

3.2 Obtenção de cromossomos mitóticos

Para a obtenção de cromossomos mitóticos foi utilizada a metodologia descrita por Gold et al. (1990), com algumas modificações. O rim (órgão hematocitopoiético) foi removido e transferido para uma cuba de vidro contendo 4 mL de meio de cultura RPMI 1640 a temperatura ambiente, tendo sido o material dissociado com o auxílio de seringas descartáveis sem agulha. Em seguida foi adicionado ao material dissociado 4 gotas (4 μ L) de colchicina 0,0125%, a temperatura ambiente por 30 minutos. Foi utilizada uma pipeta Pasteur, para ressuspender o material e posteriormente, o material foi transferido para um tubo Falcon de 10 mL e centrifugado durante 10 minutos a 900 rpm.

O sobrenadante foi removido com uma pipeta Pasteur sendo acrescentado ao tubo solução hipotônica de KCl a 0,075M de modo a completar o volume do tubo Falcon. O material foi ressuspensionado e incubado durante 30 minutos em estufa a 37°C. Passado esse

tempo, o material foi ressuspensionado novamente com bastante cuidado, a suspensão obtida foi transferida para um novo tubo, de modo que foram descartados os pedaços de tecido que não foram digeridos; e acrescentou-se o fixador (álcool metílico 3: ácido acético 1) recém preparado sendo centrifugado por 10 minutos, essa etapa seguiu por três ciclos de ressuspensão e centrifugação durante 10 minutos. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, foi adicionado 1,5 mL de fixador. A suspensão foi transferida para microtubo Eppendorf de 1,5 mL e conservada em freezer a -20 °C.

Para a preparação das lâminas, as mesmas foram previamente imersas em álcool, lavadas, secas ao ar e posteriormente imersas em água destilada a 60°C. Após 1 minuto e 20 segundos, as lâminas foram retiradas da água de forma a manter uma película de água sobre a sua superfície, na qual foi gotejada 4 gotas (4 µL) de suspensão celular em diferentes regiões. As lâminas foram secas ao ar e em seguida coradas em Giemsa 5% por 10 minutos e observadas em microscópio óptico para mapeamento das metáfases em lâmina branca.

3.3 Análise das lâminas

Inicialmente efetuou-se uma análise quantitativa de metáfases, onde foi realizado o mapeamento dessas metáfases em lâmina branca. Nessa análise prévia observou-se uma abundância de cromossomos metafásicos na maioria das amostras. Dessa forma, foram analisadas aproximadamente 20 metáfases por espécimes do grupo controle e cerca de 50 metáfases por espécimes do grupo experimental.

3.4 Detecção da Heterocromatina Constitutiva (Técnica de Bandeamento C)

Após analisar as preparações celulares, as lâminas foram submetidas à técnica de bandeamento C, que consiste na caracterização da heterocromatina, técnica descrita Sumner (1972), com algumas modificações, na qual, as lâminas com a suspensão celular foram tratadas com HCl 0,2N a temperatura ambiente, por 2 minutos, lavadas rapidamente em água destilada à temperatura ambiente e secas ao ar.

Em seguida, as lâminas foram incubadas em solução de hidróxido de bário a 5%, recém preparada e filtrada, a 42 °C, por 2 minutos e 30 segundos, onde foi interrompida a ação do hidróxido de bário imergindo-se a lâmina em solução de HCl 0,2N (temperatura ambiente) por cerca de 30 segundos, sendo posteriormente lavada em água destilada. Após secas, as lâminas foram incubadas em solução 2xSSC (Cloreto de Sódio 0,3M e Citrato

Trisódico 0,03M, pH 6,8) em banho-maria a 60°C, por um período de 30 minutos, lavadas e secas ao ar. Posteriormente as lâminas foram coradas com 20 µL de antifade e 0,5 µL de iodeto por lâmina (Lu et al. 2015). A captura dos cromossomos metafásicos foi realizada por meio do software Image-PRO MC 6.0. Tanto os espécimes do grupo controle como os dos grupos experimentais foram avaliados quanto ao padrão de distribuição da heterocromatina.

3.5 Extração de DNA total

A extração de DNA foi realizada a partir do tecido muscular, utilizando o protocolo básico de Sambrook e Russel (2001) com algumas modificações. Foram macerados aproximadamente 20 mg de tecido muscular e transferidos para um tubo de volume de 1,5 mL. Logo após foram adicionados 500 µL de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM em pH 8,0, NaCl 0,3 M, EDTA 10 mM, SDS 1%) conforme Estoup et al. (1993) e com o acréscimo de Uréia 4 M conforme Asahida et al. (1996). Em seguida foram acrescentados: 15 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 6 µL de RNase (10 mg/mL).

As amostras foram incubadas a 60 °C por aproximadamente 2 horas para que o tecido fosse totalmente digerido. Foram adicionados 100 µL de acetato de amônio 3M, 1 volume (600 µL) de fenol-clorofórmio (1:1) e agitado por inversão, por alguns minutos. Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 14.000 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionados 600 µL de clorofórmio e misturado, cuidadosamente, por alguns minutos, por inversão. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 20 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde foram acrescentados 100 µL de acetato de amônio 3M, 1 volume (600 µL) de isopropanol gelado e misturado por inversão.

O precipitado foi deixado a -20 °C *overnight*. O material foi retirado do freezer e em seguida passou por centrifugação por 30 minutos a 14.000 rpm, e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado por 20 minutos a 14.000 rpm. Novamente, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi seco em estufa a 55 °C, ressuspendido em 100 µL de água milli- Q e ficou eluindo *overnight*. Para possibilitar a análise da quantidade e integridade do material, o DNA extraído foi quantificado por comparação com marcador de DNA bacteriófago Lambda, em eletroforese padrão (com tampão Tris-Borato-EDTA 0,5X e corrida a 70 V por 40 minutos) em gel de agarose 0,8% e corado com GelRed Acid Gel Stain (Biotium 1:500). A visualização e análise do DNA no gel

foram feitas no transluminador de luz ultravioleta (Loccos Biotechnology). Adicionalmente, foram realizadas quantificações em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare).

3.6 Obtenção das Sondas

Foi utilizada a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), com estringência de 77% descrita por Pinkel et al. (1986) com algumas modificações. Para a amplificação dos elementos retrotransponíveis do tipo *Rex*, as sondas foram obtidas pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando os primers:

<i>Rex 1</i> RTX1-F1	5'-TTC TCC AGT GCC Volff et al.(2000) TTC AAC ACC-3'
<i>Rex 1</i> RTX1-R3	5'- TCC CTC AGC AGA Volff et al.(2000) AAG AGT CTG CTC-3'
<i>Rex 3</i> RTX3-F3	5'-CGG TGA YAA AGG Volff et al. (1999; 2001a) GCA GCC CTG-3'
<i>Rex 3</i> RTX3-R3	5'-TGG CAG ACN GGG Volff et al. (1999; 2001a) GTG GTG GT-3'
<i>Rex 6</i> Medf1	5'-TAA AGC ATA CAT Volff et al. (2001b) GGA GCG CCA C-3'
<i>Rex 6</i> Medr2	5'-GGT CCT CTA CCA Volff et al. (2001b) GAG GCC TGG G-3'

Os produtos resultantes da PCR foram marcados por Digoxigenina via reação *Nick Translation*, utilizando o kit DIG-NickTM Translation Mix (Roche) conforme as orientações do fabricante, para a obtenção das sondas. Para tanto, em um tubo de eppendorf de 1,5 mL, mantido no gelo, foi preparada uma solução contendo 1 µL de sonda de DNA (200 ng/µL); 2 µL de mix do Kit e 7 µL de H₂O milli-Q, totalizando 10 µL, para cada lâmina hibridizada. Esta solução foi homogeneizada, centrifugada brevemente e incubada a 16 °C por 90 minutos e a 65° C por 10 minutos no termociclador, mantida em freezer a -20 °C para utilização posterior.

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador Applied Biosystems, para volume final de 25 µL (1 µL de DNA genômico (100 ng); 5 µL de Tampão 5X; 4,5 µL de cloreto de magnésio (25 mM); 0,2 µL de Taq DNA Polimerase (5U/µL); 2,5 µL de dNTP (2,5 mM); 1 µL de cada *primer* (10 pmol); 9,8 µL de H₂O milli-Q.

3.7 Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH)

3.8 Tratamento das lâminas

As lâminas foram lavadas em tampão PBS 1x por 3 minutos em temperatura ambiente. Sendo desidratadas em série alcoólicas geladas (70%, 85% e 100%) durante 3 minutos cada. Posteriormente foram incubadas em 90 µL de RNase 40 µg/mL (0,4 µL de RNase 10 mg/mL e 99,6 µL de 2XSSC) por 1 hora em câmara úmida a 37 °C. As lâminas foram lavadas três vezes em 2xSSC durante 3 minutos cada. Logo após, foram lavadas em PBS 1x durante 3 minutos.

3.9 Desnaturação

As lâminas foram fixadas em formaldeído 1% em PBS 1X/50mM MgCl₂ durante 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foram lavadas em PBS 1x por 5 minutos. Posteriormente, as lâminas foram desidratadas em série alcoólicas geladas (70%, 85% e 100%), durante 3 minutos cada, sendo secas ao ar. Em seguida foram desnaturadas em formamida 70% em 2xSSC a 70 °C por 5 minutos e novamente desidratadas em etanol gelado 70%, 85% e 100% por 5 minutos cada e secas ao ar.

3.10 Solução de hibridização

Em um tubo *ependorf*, adicionou-se 2,5 µL de sonda; 25 µL de formamida 100% (50% do volume final); 10 µL de sulfato de dextrano 50% ; 5 µL de 20xSSC e 7 µL de H₂O milli-Q. A sonda foi desnaturada a 99 °C por 10 minutos e passada imediatamente ao gelo.

3.11 Hibridização

Foram colocados 40 µL de solução de hibridização sobre cada lamínula, sendo a lâmina invertida sobre a lamínula. As lâminas foram mantidas com o material voltado para baixo em câmara úmida (H₂O destilada) a 37 °C *overnight*.

3.12 Lavagens

As lamínulas foram removidas das lâminas e lavadas 1 vez em formamida 15%, 0,2xSSC pH 7,0 a 42 °C durante 5 minutos e seguidamente lavadas em solução Tween 0,5%, em temperatura ambiente durante 5 minutos.

3.13 Detecção

As lâminas foram incubadas em tampão NFDM (Nonfat dry milk) (5% NFDM/4xSSC) por 15 minutos e lavadas 2 vezes com Tween 5%, temperatura ambiente por 5 minutos.

3.14 Montagem das lâminas

Foi preparado no tubo *eppendorf* um mix contendo 20 µL de anti digoxigenina-rodamina (1:200) e colocado sobre a lamínula, após isso a lâmina foi invertida sobre a lamínula e incubada por 60 minutos em câmara úmida a 37 °C. Passado esse período a lâmina foi lavada 3 vezes com Tween 5% a temperatura ambiente por 3 minutos, desidratada em série alcoólica 70%, 85% e 100% durante 3 min cada, e seca ao ar. A montagem da lâmina foi realizada adicionando 20 µL de antifade + 1 µL de DAPI e coberta com lamínula.

3.15 Montagem dos cariótipos

Após a análise e contagem dos cromossomos metafásicos mitóticos obtidos com a técnica de Bandeamento C e FISH, as melhores metáfases foram fotografadas no microscópio de fluorescência Olympus BX51 em objetiva de imersão e para a captura das imagens foi utilizado o software Image-PRO MC 6.0, juntamente com as metáfases submetidas à técnica da (FISH). Para a montagem dos cariótipos foi utilizado o programa Adobe Photoshop CS6, onde os cromossomos foram recortados e emparelhados e agrupados de acordo com a sua morfologia e colocados em ordem decrescente de tamanho.

4. Resultados

4.1 Caracterização cromossômica

A análise das metáfases resultou num número diplóide de 54 cromossomos (26m + 28sm) e número fundamental (NF) 108, como já caracterizado em *C. macropomum* (Nakayama et al. 2012, Ribeiro et al. 2014).

O número de metáfases por lâmina aumentou significativamente de acordo com o aumento da concentração de Triclorfon e do tempo de exposição dos animais ao agente estressor, alcançando mais de 100 metáfases contabilizadas na concentração C2 e tempo 96h. Sendo que conforme a quantificação em lâmina branca, em média 5 metáfases por lâmina foi

considerado o número mínimo contabilizado (especificamente nos grupos controles), número mediano correspondeu a cerca de 60 metáfases por lâmina. Esse resultado parece sugerir um aumento do potencial mitótico da célula produzido pela ação do Triclorfon nos exemplares expostos à maior concentração e ao maior período de exposição.

Com relação à distribuição da heterocromatina constitutiva, foram constatadas diferenças entre as condições em que os espécimes estiveram expostos. Foi evidenciada a presença predominante de blocos heterocromáticos nas porções centroméricas de todos os pares de cromossomos mitóticos do grupo controle (Figura 3a), enquanto que os indivíduos provenientes do grupo experimental C1-48h (Figura 3b) apresentaram, além de blocos centroméricos, blocos conspícuos nas regiões terminais de alguns pares cromossômicos (pares: 7, 8, 16 e 18). Os espécimes correspondentes a C2-48h (Figura 3c), apresentaram também blocos conspícuos nas regiões centroméricas e marcações biteloméricas no par 4, além de blocos heterocromáticos nas regiões terminais dos cromossomos dos pares: 7, 8 e 16 e blocos intersticiais no par 18.

Na condição referente à C2-72h (Figura 3d), os indivíduos apresentaram marcações cromossômicas conspícuas nas regiões centroméricas e marcações biteloméricas nos pares 4 e 8, presença de blocos heterocromáticos nas regiões terminais dos pares 7 e 16 e blocos intersticiais no par 18, além de marcação terminal do par 26. Contudo, nos indivíduos oriundos da maior concentração do Triclorfon e no tempo mais prolongado, ou seja, na condição C2-96h (Figura 3e) observaram-se marcações que diferiram das demais condições. Nessa condição os indivíduos apresentaram além de marcações heterocromáticas em regiões centroméricas, como observado em grande parte dos cariótipos, a presença de blocos heterocromáticos mais conspícuos se comparados com indivíduos provenientes de todas as demais condições experimentais testadas, bem como a presença de bloco centromérico e terminal no par 1 e marcações biteloméricas nos homólogos dos pares 4, 7 e 8, marcação na região terminal do par 16, e presença de blocos intersticiais no par 18 e marcação terminal no par 26.

Quanto ao mapeamento cromossômico dos elementos retrotransponíveis do tipo *Rex* observaram-se marcações predominantemente difusas na totalidade dos cromossomos. Entretanto, os espécimes provenientes ao grupo controle (Figura 4a), apresentaram marcações para *Rex1* de forma sutil e pouco visível. Na condição C1-48h (Figura 4b) observou-se pouca diferença na intensidade das marcações quando comparado ao grupo controle. Na condição

C1-72h (Figura 4c) nota-se um pequeno aumento no número de marcações. Porém na condição C2-48h (Figura 4d) é considerável a diferença na distribuição e intensidade das marcações quando correlacionada ao grupo controle e experimental expostos a concentração 1. Esse aumento de marcações é mantido na condição C2-72h (Figura 4e) e na condição C2-96h (Figura 4f).

Em relação ao mapeamento do retroelemento *Rex3*, os espécimes pertencentes ao grupo controle (Figura 5a) apresentaram marcações difusas pouco evidentes. Na condição C1-48h (Figura 5b), percebe-se certo aumento no número de marcações desse retroelemento. Todavia a partir da condição C1-72h (Figura 5c), verificou-se que o aumento na marcação de sítios *Rex3* começa a se tornar mais evidente, até mesmo abrangendo a região terminal de alguns pares de cromossomos, esse mesmo padrão se mantém na condição C2-48h (Figura 5d). Quando se trata da condição C2-72h (Figura 5e) é notável um aumento de sítios deste retrotransposon, com marcações conspícuas em todo cariótipo, revelando blocos evidentes nas porções terminais de todos os cromossomos (ambos os braços). Contudo na condição C2-96h (Figura 5f) é evidente o aumento na distribuição e intensidade do número de sítios de *Rex3* sendo constatado um grande aumento de marcações desta sequência, em que todos os cromossomos apresentam-se marcados completamente em toda a sua extensão cromossômica abrangendo tanto porções heterocromáticas quanto porções eucromáticas dos cromossomos. Nessa condição é ainda observada a formação de blocos nas porções terminais de todos os homólogos em ambos os braços.

Referente ao mapeamento de *Rex6* o grupo controle, (Figura 6a) caracteriza-se por marcações pouco evidentes. Na condição C1-48h (Figura 6b), observam-se diferenças mínimas nas marcações considerando o grupo controle. Na condição C1-72h (Figura 6c) observa-se um aumento sutil no número de marcações. Porém na condição C2-48h (Figura 6d) observa-se um aumento na intensidade das marcações. Esse padrão demonstra-se conservado nas condições C2-72h (Figura 6e) e na condição C2-96h (Figura 6f).



Figura 3. Cariótipos de *C. macropomum* submetidos ao Bandeamento C para evidenciar padrão de distribuição da heterocromatina em indivíduos: a) Controle; b) Concentração 1-48h; c) Concentração 2-48h; d) Concentração 2-72h; e) Concentração 2-96h.

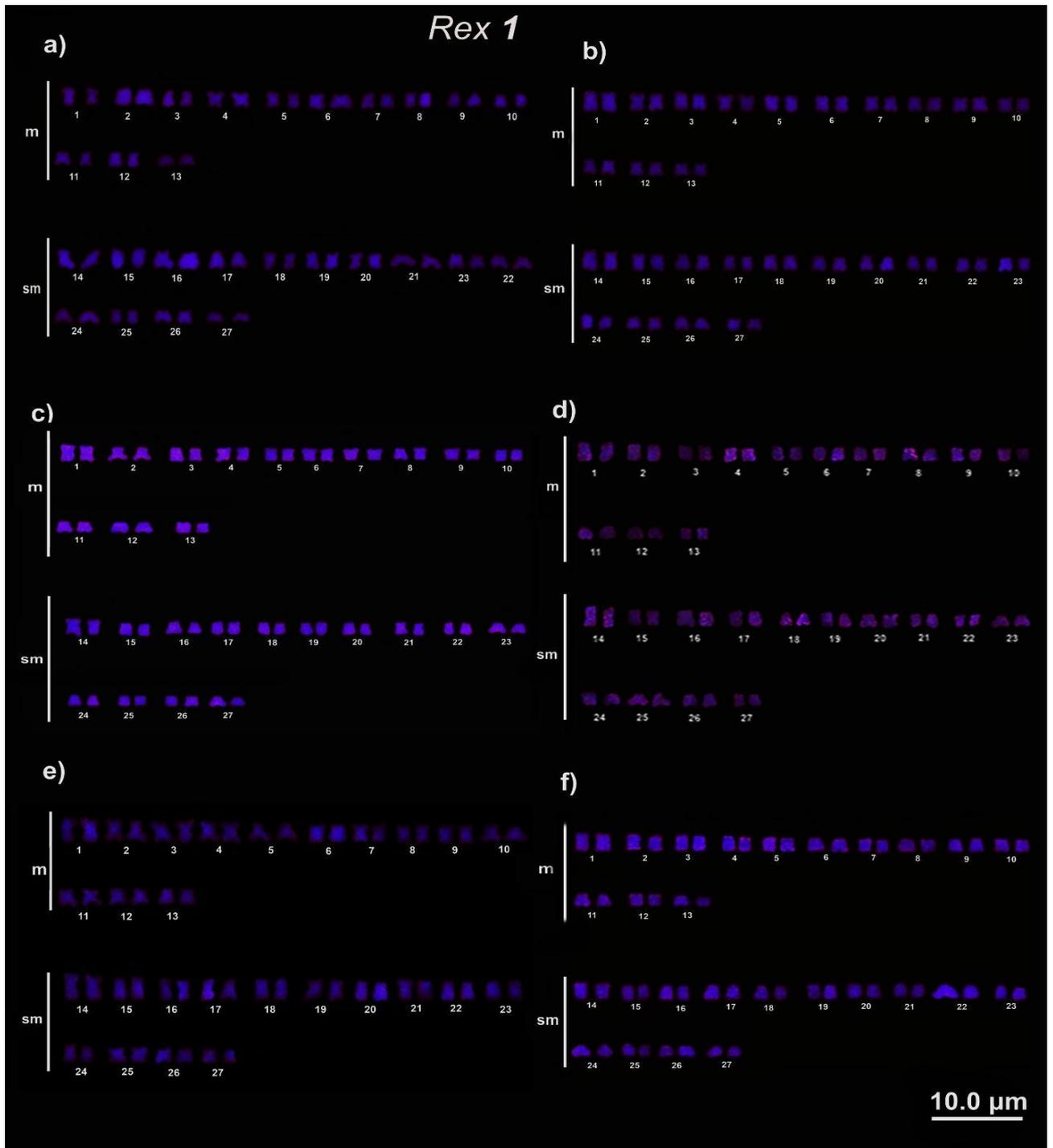


Figura 4. Mapeamento físico cromossômico do retroelemento *Rex 1* (sinal vermelho) em *C. macropomum*: a) Controle; b) Concentração 1- 48h; c) Concentração 1-72h; d) Concentração 2-48h; e) Concentração 2-72h; f) Concentração 2-96h.

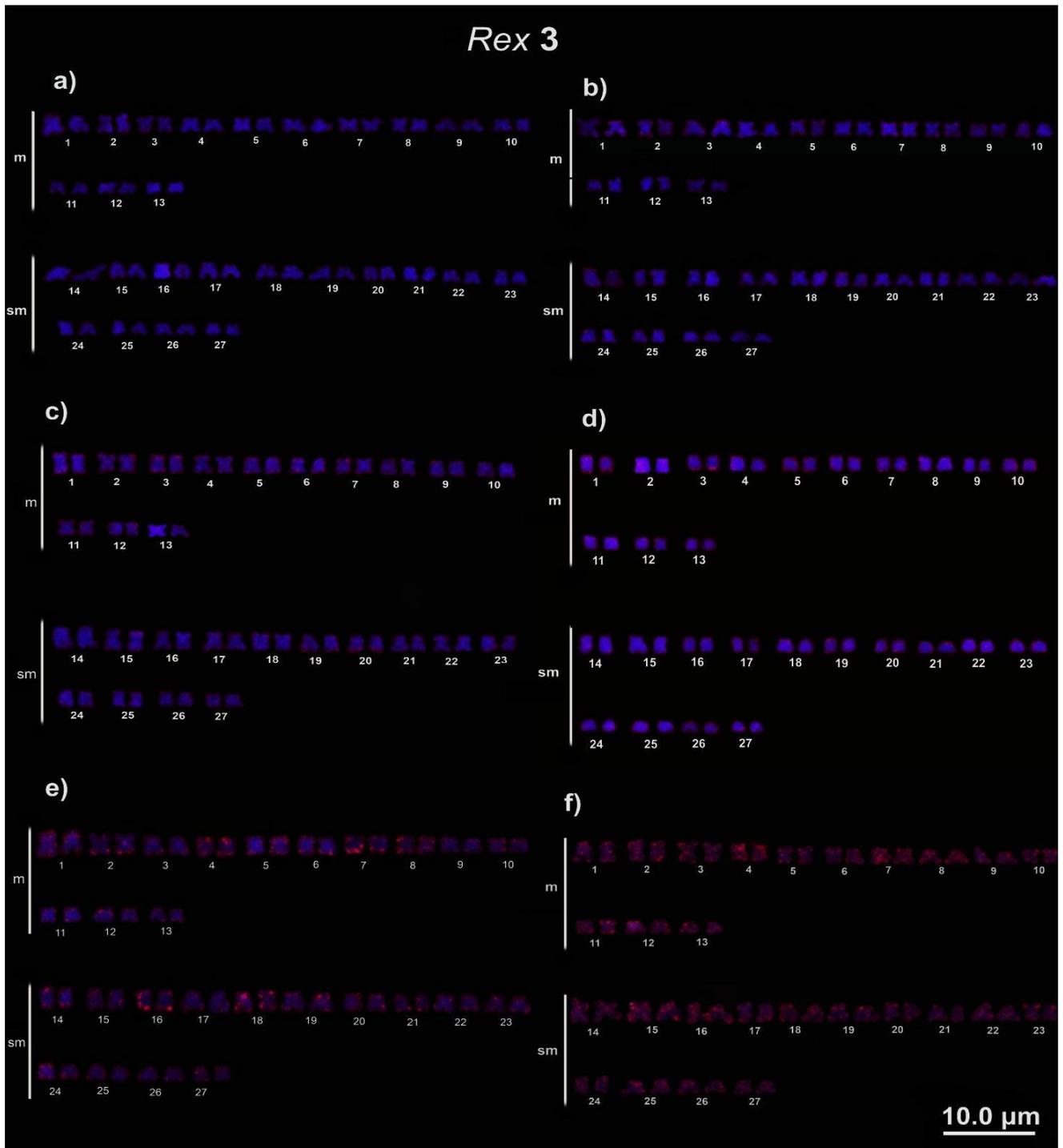


Figura 5. Mapeamento físico cromossômico do retroelemento *Rex 3* (sinal vermelho) em *C. macropomum*: a) Controle; b) Concentração 1-48h; c) Concentração 1-72h; d) Concentração 2-48h; e) Concentração 2-72h; f) Concentração 2-96h.

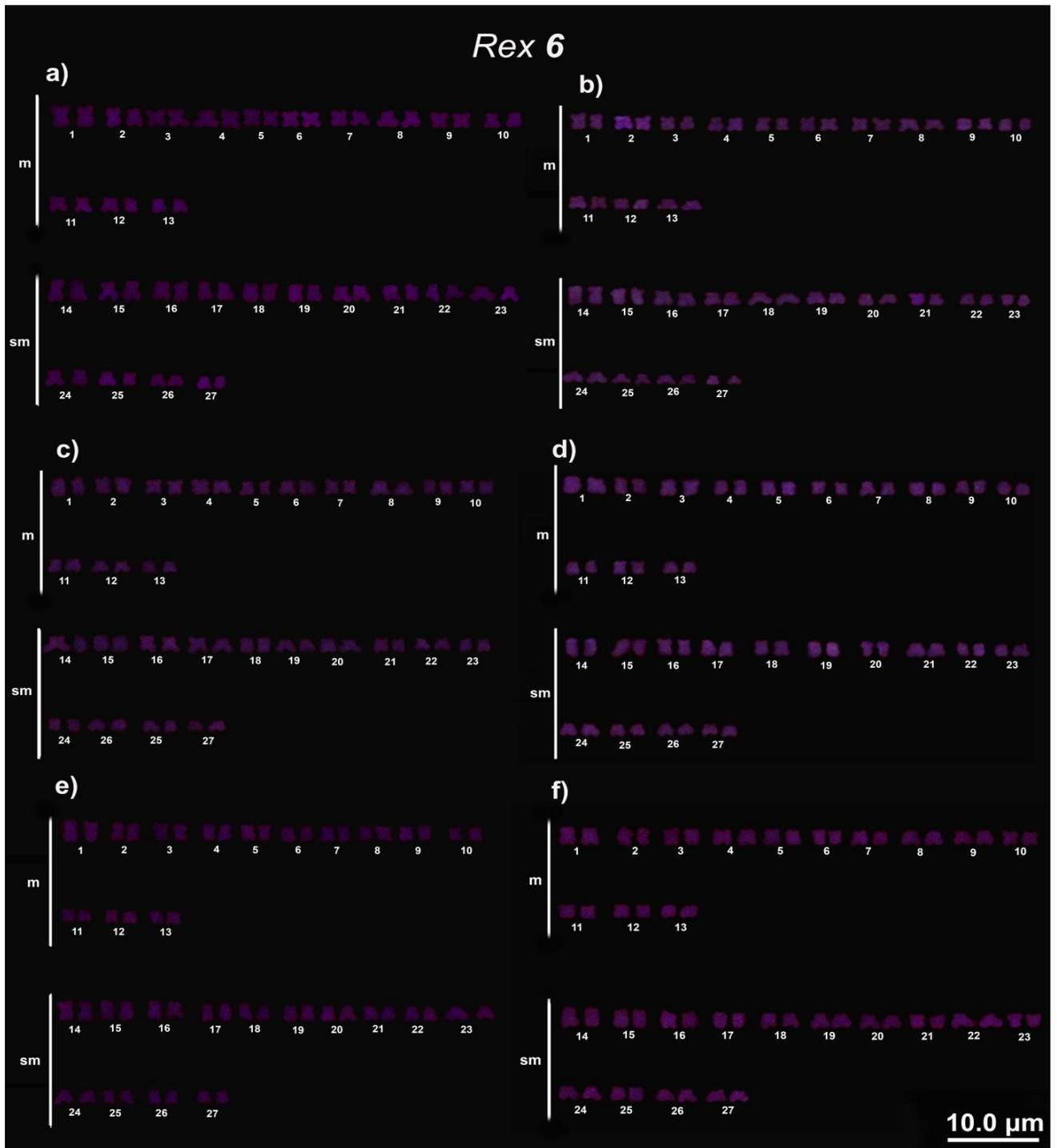


Figura 6. Mapeamento físico cromossômico do retroelemento *Rex 6* (sinal vermelho) em *C. macropomum*: a) Controle; b) Concentração 1-48h; c) Concentração 1-72h; d) Concentração 2-48h; e) Concentração 2-72h; f) Concentração 2-96h.

5. Discussão

Diversos estudos evidenciam que sequências repetitivas não se encontram distribuídas aleatoriamente no genoma dos organismos, mas ligadas a regiões intergênicas, heterocromáticas compreendendo os elementos transponíveis (Bueno et al. 2013, Martins et al. 2013, de Freitas Mourão et al. 2017). Elementos transponíveis estão presentes em praticamente todos os eucariotos, abrangendo cerca de 80% dos procariotos (Hua-Van et al. 2011). Embora sejam abundantes no genoma, os elementos transponíveis permanecem reversivelmente inativos, isto é, epigeneticamente silenciados através da repressão ocasionada por mecanismos de regulação gênica (Zeh et al. 2009, Silva et al. 2016, Thiebaut et al. 2019), porém estresses ambientais podem causar interrupção nessa regulação e provocar a ativação da transposição destas sequências (Dubin et al. 2018).

Entretanto a ativação de ETs também pode acontecer não relacionada diretamente a um estresse específico, mas ligada a efeitos que esse estresse produz em outros mecanismos celulares, proporcionando uma ativação rápida de cópias específicas desses elementos (Dai et al. 2007, Coros et al. 2009). A transposição desses elementos pode ocasionar alterações nos padrões de recombinação do DNA, influenciando totalmente a organização da arquitetura genômica (Kidwell and Lisch 2000, Le Rouzic and Capy 2005).

Quando certa atividade de transposição é induzida por estresse, pode refletir na diversidade genética necessária para que as espécies consigam se adaptar às mudanças ambientais, ETs potencialmente ativos podem aumentar a capacidade do genoma para lidar com essas mudanças. Portanto a natureza repetitiva bem como sua habilidade de mobilização confere aos ETs uma importante fonte de mutações nos genomas, variando de mutações regulatórias sutis à grandes rearranjos genômicos, podendo gerar efeitos fenotípicos complexos (Casacuberta e González 2013). A implantação e manutenção de modificações epigenéticas podem cooperar para o surgimento de variabilidade dos fenótipos, regulando a expressão gênica em consequência do estímulo ao estresse (Sides et al. 2014).

Os elementos transponíveis podem desempenhar um papel importante na adaptação devido sua capacidade de gerar variadas mutações de grande amplitude (Biémont e Vieira 2006, Hua-Van et al. 2011, Casacuberta e González 2013). Esses elementos produzem mutações quando se movem de um local para outro no genoma podendo ocasionar quebras de DNA (Izsvák et al. 2009, Horváth et al. 2017) e mutações de grandes proporções, abrangendo, éxons, duplicações, deleções ou rearranjos de genes, através da transposição de elementos

transponíveis (Address 2012, Schrader et al. 2014). Assim, os ETs quando inseridos em um novo sítio genômico, podem resultar na interferência de uma sequência funcional existente, ou ainda adicionar sequências regulatórias e/ou marcas epigenéticas que podem afetar a atividade de genes próximos (Rebollo et al. 2012, Chuong et al. 2016, Horváth et al. 2017), isto é a ativação de ETs possivelmente é responsável por mudanças no nível de expressão de genes adjacentes (Garg et al. 2015, Hummel et al. 2017).

Em análises citogenéticas voltadas para investigar o mapeamento físico de sequências repetidas nos cromossomos de teleósteos na busca de compreender a organização dos elementos transponíveis e seu papel na diversificação de seus genomas têm-se constatado uma diversidade de padrões envolvendo a distribuição e localização desses elementos. O padrão de organização dos elementos transponíveis no genoma de peixes é diferenciado como evidenciam alguns estudos.

Ribeiro et al. (2017) ao realizarem o mapeamento dos retrotransposons *Rex3* e *Rex6* em *C. macropomum*, *Piaractus mesopotamicus* e em híbrido tambacu (*C. macropomum* X *Piaractus mesopotamicus*) observaram que em *C. macropomum* a presença de poucas marcações para o *Rex3* no entanto o *Rex6* mostrou marcações mais intensas e dispersas em vários cromossomos, já em *Piaractus mesopotamicus* observou-se aumento na quantidade de sítios *Rex3*, quando comparado ao *Rex6*, porém no híbrido o *Rex6* apresentou aumento considerável na distribuição e intensidade das marcações quando comparado a seus parentais, abrangendo quase toda extensão de alguns cromossomos, envolvendo porções heterocromáticas e eucromáticas.

O mapeamento cromossômico dos retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em oito espécies de ciclídeos revelou a localização desses elementos na região pericentromérica cromossômica (Valente et al. 2011). Costa et al. (2013) investigaram a distribuição cromossômica de *Rex1* e *Rex3* em cobia (*Rachycentron canadum*) evidenciando que o *Rex1* e *Rex3* estão preferencialmente localizados nas regiões de heterocromatina telomérica, porém o *Rex3* apresenta uma distribuição complementar na eucromatina.

Favarato et al. (2017) realizaram o mapeamento cromossômico dos retroelementos do tipo *Rex* em *Ancistrus*, este estudo mapeou sequências de *Rex1* e *Rex3* em regiões pericentroméricas dos cromossomos, além disso *Rex3* mostrou também marcações evidentes nas regiões terminais dos cromossomos. As marcações para o *Rex6* foram preferencialmente

localizadas em regiões terminais, no entanto em *Ancistrus* sp. "Purus" foram evidenciadas marcações pericentroméricas.

Estes estudos demonstram que diferentes famílias de retrotransposons podem apresentar resposta distinta de acordo com o tipo de estresse a qual for exposto (Beguiristain et al. 2001, Mansour 2007). Dessa forma no presente estudo, verificaram-se padrões distintos de distribuição dos elementos retotransponíveis *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* nos cromossomos de *C. macropomum*, após o estresse químico causado pelo Triclorfon. Foram observados sítios de marcações dispersas na maioria dos cromossomos, não caracterizando um padrão definido de distribuição destes retroelementos. Deste modo o estresse químico provavelmente causou a quebra do controle epigenético que normalmente reprime a atividade desses ETs.

A maior parte do silenciamento de ETs acontece por mecanismos epigenéticos tais como de metilação e modificações de histonas (Feschotte 2008, Schrader et al. 2014). Condições estressantes podem, no entanto, promover modificações epigenéticas que resultam na mobilização de elementos transponíveis, e grandes alterações genéticas e rearranjos cromossomos são ocasionados (Zeh et al. 2009). A perda de controle epigenético sobre ETs, resulta também na perda de metilação do DNA produzindo a reestruturação de cromatina, podendo originar em reativação de ETs, mediante a transposição (Miousse et al. 2015).

No presente estudo, nas condições experimentais C2-96h (Figura 4f), e C2-96h (Figura 6f), os elementos *Rex1* e *Rex6*, respectivamente, mostraram maior acúmulo de sequências dispersas quando comparados a C1-48h (Figuras 4b, 6b), C1-72h (Figura 4c, 6b) e ao grupo controle (Figura 4a, 6a) de *Rex1* e *Rex6*, não havendo indícios de compartimentalização nem associação com blocos heterocromáticos.

Porém ao observamos as condições exibidas em C2-72h (Figura 5e) e C2-96h (Figura 5f) para o retroelemento *Rex3* em comparação com a C1-48h (Figuras 5b), C1-72h (Figura 5c) e ao grupo controle (Figura 5a), observamos uma notável mudança no padrão de distribuição desse retroelemento. Um grande aumento de marcações desta sequência aparece em todos os cromossomos metacêntricos e submetacêntricos abrangendo tanto porções heterocromáticas quanto porções eucromáticas. São visualizados também blocos de marcações nas porções terminais de todos os homólogos em ambos os braços principalmente na condição de C2-72h (Figura 5e).

Estes resultados corroboram com trabalhos precedentes, que relatam a preferência desses retroelementos pelas regiões heterocromáticas (Dasilva et al. 2002, Fischer et al. 2004). Essa distribuição possivelmente está relacionada ao fato dessas regiões geralmente acumularem mais mutações sem serem alvos de pressões seletivas restritivas.

O padrão de distribuição difusa, entretanto, pode ser devido às funções estruturais e regulatórias desempenhadas por esses retroelementos, visto que os ETs são relevantes nas atividades regulatórias concernente ao direcionamento da expressão gênica, com capacidade de apresentar dispersão em ambos os tipos de cromatina.

Em relação ao padrão de distribuição da heterocromatina, foram constatadas diferenças entre as condições nas quais os espécimes estiveram expostos. Para o grupo controle foi observada a presença predominante de blocos heterocromáticos nas porções centroméricas dos cromossomos, contudo para os indivíduos oriundos da maior concentração do Triclorfon C2-96h (Figura 2e) as marcações foram mais conspícuas se comparadas com as marcações de indivíduos provenientes de todas as demais condições experimentais testadas. Além de marcações centroméricas e terminais, nessa condição apareceram marcações biteloméricas e intersticiais associadas a eventos de heterocromatinização e aumento do número de cópias de *Rex3*. Esse retroelemento quando comparado ao *Rex1* e *Rex6* apresenta possivelmente dispersão controlada por mecanismo distinto de heterocromatinização.

Diversos estudos em *C. macropomum* sugerem que certas adaptações ambientais podem ser induzidas por ETs, propondo que estes elementos são responsáveis pela capacidade de resposta do peixe frente a condições de estresse, além de relacionarem o processo de heterocromatinização ao aumento de sítios *Rex*, como evidenciado no estudo de Ribeiro (2013), referente a análise e distribuição de *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em *Collossoma macropomum* aclimatados em temperaturas distintas, constatou que os indivíduos mantidos a 22°C, condição apontada como estressante para o tambaqui, apresentaram cromossomos com elevado número de marcações de sítios *Rex1* e *Rex6*, além da presença de blocos conspícuos nas regiões centroméricas e teloméricas de diversos pares cromossômicos, indicando um processo de heterocromatinização.

Silva (2016) efetuou o mapeamento cromossômico e a quantificação absoluta de *Rex1* em *Collossoma macropomum* expostos ao estresse através da contaminação da água com sulfato de cobre. Foi verificado que no tempo de 48 horas houve maior número de cópias

desse retroelemento quando comparado ao controle. O aumento de sítios *Rex1* foi correlacionado ao aumento na quantidade de blocos heterocromáticos em porções centroméricas e também nos braços curtos, abrangendo quase a totalidade de alguns cromossomos nessa mesma condição experimental.

Ferreira (2019) analisou o comportamento e distribuição dos retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* e a detecção de heterocromatina nos cromossomos do tabaqui, frente aos diferentes cenários de mudanças climáticas propostos pelo Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC). Foi verificada heterocromatinização no genoma dos indivíduos submetidos ao cenário A2 (simula as condições mais extremas, com aumento de 4°C e 800ppm de CO), estando associada ao aumento no número de sítios *Rex3*.

Dessa forma, a plasticidade genômica e o comportamento de elementos transponíveis podem desempenhar um papel relevante nos processos adaptativos (Burt e Trivers, 2006, Marin et al. 2019). No presente estudo, as sequências do retroelemento *Rex3* mostraram-se mais sensíveis ao estresse químico induzido pelo Triclorfon respondendo a este agente estressor com ativação considerável de sítios *Rex3* possivelmente devido a natureza da sequência do *Rex3*, da maquinaria enzimática e também da sua interação com o genoma hospedeiro, com ampla distribuição e diferentes padrões de organização nos genomas de várias espécies de peixe.

Entretanto, dependendo do local de inserção, da sequência do TE e do mecanismo de regulação desencadeado para regulá-lo (Gogvadze e Buzdin 2009), esses elementos podem produzir grandes alterações após sua transposição ocasionando consequências danosas para o genoma, como a interferência de uma sequência funcional existente, adição de sequências regulatórias ou marcas epigenéticas que podem alterar a atividade de genes próximos (Rebollo et al. 2012, Chuong et al. 2016, Horváth et al. 2017). Por outro lado, esse mesmo mecanismo pode originar variantes genéticas e fenótipos adaptativos por meio da deriva estocástica, sendo, portanto, considerados inovadores genéticos (Franks e Hoffmann, 2012; Schrader et al. 2014).

6. Conclusão

Os elementos transponíveis consistem em entidades estruturais e reguladoras que aliadas a alterações epigenéticas podem dirigir a adaptação e evolução fornecendo fenótipos adaptativos, sobretudo por meio da retrotransposição podem responder de forma diferenciada conforme a desafios específicos de estresse, possuindo assim um papel importante no controle da expressão gênica bem como no genoma como um todo.

Nesse sentido nossos dados evidenciaram que a distribuição dos retroelementos *Rex1*, *Rex3*, *Rex6* no genoma de *C. macropomum* após ser submetido ao Triclorfon demonstraram distribuição dispersa diferenciada não se concentrando apenas em regiões específicas dos cromossomos. Essa observação é mais evidente para as condições de tempo e concentração mais intensas.

Para os sítios de *Rex1* e *Rex6* que revelaram um perfil de distribuição mais disperso nos cariótipos, cuja intensidade de marcação foi aumentando conforme o tempo de exposição dos organismos ao agente estressor, o aumento no número de cópias e a distribuição dos elementos foi mais sutil. Entretanto para os sítios de *Rex3* o aumento na intensidade de marcações e no padrão de distribuição, além da associação com blocos heterocromáticos, foi visivelmente proeminente. A ocorrência de blocos heterocromáticos associados às sequências *Rex3* possivelmente mediadas por mecanismos epigenéticos adaptativos são provavelmente voltados à repressão da mobilização desses retroelementos.

Em nosso estudo verificou-se que o agente estressor Triclorfon amplamente utilizado no cultivo em cativeiro para mitigar os efeitos de infecções parasitárias em peixes, possui um efeito considerável sobre a mobilização de sequências repetitivas, mais precisamente de retroelementos do tipo *Rex* no genoma de tambaqui. Essa ativação e transposição pode ter efeitos controversos no genoma desse hospedeiro, agindo como um mecanismo de adaptabilidade ao ambiente estressor com surgimento de variabilidade genética ou como um agente egoísta parasitário do genoma.

Ainda segundo nossos resultados, o Triclorfon exerce um papel substancial no processo de ativação do ciclo celular, devido ao aumentado número de metáfases visualizadas nas condições mais extremas do experimento. A compreensão acerca da retrotransposição ativada por estresse químico ainda não se encontra plenamente elucidada, sendo imprescindíveis estudos complementares no intuito de gerar mais informações sobre a

distribuição e regulação dessas sequencias além de melhorar a concepção dos processos e mecanismos que envolvem a grande plasticidade que distingue os genomas dos vertebrados.

7. Referências Bibliográficas

- Address, P. 2012. Transposable Elements, Epigenetics, and Genome Evolution. *Science* 338.
- Albuquerque, A.F.; Ribeiro, J.S.; Kummrow, F.; Nogueira, A.J.A.; Montagner, C.C.; Umbuzeiro, G.A. 2016. Pesticides in Brazilian freshwaters: A critical review. *Environmental Science: Processes and Impacts* 18: 779–787.
- Barbosa, C.M.; Mareco, E.A.; Silva, M.D.P.; Martins, C.; Alves-Costa, F.A. 2014. Differential expression of a retrotransposable element, Rex6 , in *Colossoma macropomum* fish from different Amazonian environments. *Mobile Genetic Elements* 4: e30003.
- Beguiristain, T.; Grandbastien, M.A.; Puigdomènech, P.; Casacuberta, J.M. 2001. Three Tnt1 subfamilies show different stress-associated patterns of expression in tobacco. Consequences for retrotransposon control and evolution in plants. *Plant physiology* 127: 212–221.
- Biémont, C.; Vieira, C. 2006. Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* 443: 521–524.
- Boulanouar, S.; Mezzache, S.; Combès, A.; Pichon, V. 2018. Molecularly imprinted polymers for the determination of organophosphorus pesticides in complex samples. *Talanta* 176: 465–478.
- Bueno, D.; Palacios-Gimenez, O.M.; Cabral-de-Mello, D.C. 2013. Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in the Grasshopper *Abracris flavolineata* Reveal Possible Ancestry of the B Chromosome and H3 Histone Spreading. *PLoS ONE* 8.
- Carducci, F.; Barucca, M.; Canapa, A.; Biscotti, M.A. 2018. Rex retroelements and teleost genomes: An overview. *International Journal of Molecular Sciences* 19.
- Casacuberta, E.; González, J. 2013. The impact of transposable elements in environmental adaptation. *Molecular Ecology* 22: 1503–1517.
- Chang, C.C.; Rahmawaty, A.; Chang, Z.W. 2013. Molecular and immunological responses of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, to the organophosphorus insecticide, trichlorfon. *Aquatic Toxicology* 130–131: 18–26.

- Charlesworth, B.; Sniegowski, P.; Stephan, W. 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371: 215–220.
- Chu, C.-G.; Tan, C.T.; Yu, G.-T.; Zhong, S.; Xu, S.S.; Yan, L. 2011. A Novel Retrotransposon Inserted in the Dominant Vrn-B1 Allele Confers Spring Growth Habit in Tetraploid Wheat (*Triticum turgidum* L.) . *Genes/Genomes/Genetics* 1: 637–645.
- Chuong, E.B.; Elde, N.C.; Feschotte, C. 2016. Regulatory evolution of innate immunity through co-option of endogenous retroviruses. *Science* 351: 1083–1087.
- Coros, C.J.; Piazza, C.L.; Chalamcharla, V.R.; Smith, D.; Belfort, M. 2009. Global Regulators Orchestrate Group II Intron Retromobility. *Molecular Cell* 34: 250–256.
- Costa, G.W.W.F.; Cioffi, M.B.; Bertollo, L.A.C.; Molina, W.F. 2013. Transposable elements in fish chromosomes: A study in the marine cobia species. *Cytogenetic and Genome Research* 141: 126–132.
- Dai, J.; Xie, W.; Brady, T.L.; Gao, J.; Voytas, D.F. 2007. Phosphorylation Regulates Integration of the Yeast Ty5 Retrotransposon into Heterochromatin. *Molecular Cell* 27: 289–299.
- Daniel, S.N.; Silva, D.M.Z.A. 2015. Organization and Chromosomal Distribution of Histone Genes and Transposable Rex Elements in the Genome of *Astyanax bockmanni* (Teleostei , Characiformes). : 311–318.
- Dasilva, C.; Hadji, H.; Ozouf-Costaz, C.; Nicaud, S.; Jaillon, O.; Weissenbach, J.; et al. 2002. Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 13636–13641.
- Dubin, M.J.; Mittelsten Scheid, O.; Becker, C. 2018. Transposons: a blessing curse. *Current Opinion in Plant Biology* 42: 23–29.
- Fernandes, L.S.; Emerick, G.L.; Santos, N.A.G. do.; de Paula, E.S.; Barbosa, F.; Santos, A.C. dos. 2015. In vitro study of the neuropathic potential of the organophosphorus compounds trichlorfon and acephate. *Toxicology in Vitro* 29: 522–528.
- Finnegan, D.J. 1989. eUKARYOTIC TRANSPOSABLE. .

- Fischer, C.; Bouneau, L.; Coutanceau, J.P.; Weissenbach, J.; Volff, J.N.; Ozouf-Costaz, C. 2004. Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Gene* 336: 175–183.
- Florindo, L.H. 2006. The role of branchial and orobranchial O₂ chemoreceptors in the control of aquatic surface respiration in the neotropical fish tambaqui (*Colossoma macropomum*): progressive responses to prolonged hypoxia. *Journal of Experimental Biology* 209: 1709–1715.
- Fouz, B.; Esteve-Gassent, M.D.; Barrera, R.; Larsen, J.L.; Nielsen, M.E.; Amaro, C. 2001. Field testing of a vaccine against eel diseases caused by *Vibrio vulnificus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 45: 183–189.
- de Freitas Mourão, A.A.; Natal Daniel, S.; Teruo Hashimoto, D.; Cristina Ferreira, D.; Porto-Foresti, F. 2017. Organization and Distribution of Repetitive DNA Classes in the *Cichla kelberi* and *Cichla piquiti* Genome. *Cytologia* 82: 193–197.
- Garg, R.; Narayana Chevala, V.; Shankar, R.; Jain, M. 2015. Divergent DNA methylation patterns associated with gene expression in rice cultivars with contrasting drought and salinity stress response. *Scientific Reports* 5: 1–16.
- Gogvadze, E.; Buzdin, A.A. 2009. Retroelements and their impact on genome evolution and functioning. : 3727–3742.
- Gross, M.C.; Feldberg, E.; Cella, D.M.; Schneider, M.C.; Schneider, C.H.; Porto, J.I.R.; et al. 2009. Intriguing evidence of translocations in *Discus* fish (*Symphysodon*, Cichlidae) and a report of the largest meiotic chromosomal chain observed in vertebrates. *Heredity* 102: 435–441.
- Hashimoto, D.T.; Mendonça, F.F.; Senhorini, J.A.; de Oliveira, C.; Foresti, F.; Porto-Foresti, F. 2011. Molecular diagnostic methods for identifying Serrasalmid fish (Pacu, Pirapitinga, and Tambaqui) and their hybrids in the Brazilian aquaculture industry. *Aquaculture* 321: 49–53.
- Herbert, J.; Thiermann, H.; Worek, F.; Wille, T. 2019. COPD and asthma therapeutics for supportive treatment in organophosphate poisoning. *Clinical Toxicology* 0: 1–8.
- Horváth, V.; Merenciano, M.; González, J. 2017. Revisiting the Relationship between

- Transposable Elements and the Eukaryotic Stress Response. *Trends in Genetics* 33: 832–841.
- Hua-Van, A.; Le Rouzic, A.; Boutin, T.S.; Filée, J.; Capy, P. 2011. The struggle for life of the genome's selfish architects. *Biology Direct* 6: 1–29.
- Hummel, B.; Hansen, E.C.; Yoveva, A.; Aprile-Garcia, F.; Hussong, R.; Sawarkar, R. 2017. The evolutionary capacitor HSP90 buffers the regulatory effects of mammalian endogenous retroviruses. *Nature Structural and Molecular Biology* 24: 234–242.
- Izsvák, Z.; Chuah, M.K.L.; VandenDriessche, T.; Ivics, Z. 2009. Efficient stable gene transfer into human cells by the Sleeping Beauty transposon vectors. *Methods* 49: 287–297.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2017. *Produção Pecuária Municipal 2017*. Rio de Janeiro, V. 45.
- Jordaan, M.S.; Reinecke, S.A.; Reinecke, A.J. 2013. Biomarker responses and morphological effects in juvenile tilapia *Oreochromis mossambicus* following sequential exposure to the organophosphate azinphos-methyl. *Aquatic Toxicology* 144–145: 133–140.
- Jurka, J.; Kapitonov, V. V.; Kohany, O.; Jurka, M. V. 2007. Repetitive Sequences in Complex Genomes: Structure and Evolution. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 8: 241–259.
- Kidwell, M.G.; Lisch, D.R. 2000. Transposable elements and host genome evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 95–99.
- Kidwell, M.G.; Lisch, D.R. 2001. Perspective: transposable elements, parasitic dna, and genome evolution. 55: 1–24.
- Kloc, A.; Martienssen, R. 2008. RNAi, heterochromatin and the cell cycle. *Trends in Genetics* 24: 511–517.
- Le, T.N.; Schumann, U.; Smith, N.A.; Tiwari, S.; Khang Au, P.C.; Zhu, Q.H.; et al. 2014. DNA demethylases target promoter transposable elements to positively regulate stress responsive genes in *Arabidopsis*. *Genome Biology* 15: 1–18.
- Lerat, E.; Casacuberta, J.; Chaparro, C. 2019. On the Importance to Acknowledge Transposable Elements in Epigenomic Analyses. .

- Lu, J.; Zhang, M.; Lu, L. 2018. Tissue metabolism, hematotoxicity, and hepatotoxicity of trichlorfon in *Carassius auratus gibelio* after a single oral administration. *Frontiers in Physiology* 9: 1–9.
- Makarevitch, I.; Waters, A.J.; West, P.T.; Stitzer, M.; Hirsch, C.N.; Ross-Ibarra, J.; et al. 2015. Transposable Elements Contribute to Activation of Maize Genes in Response to Abiotic Stress. *PLoS Genetics* 11.
- Marin, P.; Genitoni, J.; Barloy, D.; Maury, S.; Gibert, P.; Ghalambor, C.K.; et al. 2019. *Biological invasion: The influence of the hidden side of the (epi)genome*. .
- Martins, C. 2007. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. *Fish Cytogenetics*: 421–453.
- Martins, N.F.; Bertollo, L.A.C.; Troy, W.P.; Feldberg, E.; de Souza Valentin, F.C.; de Bello Cioffi, M. 2013. Differentiation and evolutionary relationships in *Erythrinus erythrinus* (Characiformes, Erythrinidae): Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 23: 261–269.
- Miousse, I.R.; Chalbot, M.C.G.; Lumen, A.; Ferguson, A.; Kavouras, I.G.; Koturbash, I. 2015. Response of transposable elements to environmental stressors. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 765: 19–39.
- Mladenović, M.; Arsić, B.B.; Stanković, N.; Mihović, N.; Ragno, R.; Regan, A.; et al. 2018. The targeted pesticides as acetylcholinesterase inhibitors: Comprehensive cross-organism molecular modelling studies performed to anticipate the pharmacology of harmfulness to humans in vitro. *Molecules* 23.
- Padeken, J.; Zeller, P.; Gasser, S.M. 2015. Repeat DNA in genome organization and stability. *Current Opinion in Genetics and Development* 31: 12–19.
- Pezer, Ž.; Brajković, J.; Feliciello, I.; Ugarković, Đ. 2012. Satellite DNA- Mediated Effects on. *Garrido- Ramos MA (ed): Repetitive DNA. Genome Dyn. Basel, Karger. 7: 153–169.*
- Philippsen, G.S.; Avaca-Crusca, J.S.; Araujo, A.P.U.; DeMarco, R. 2016. Distribution patterns and impact of transposable elements in genes of green algae. *Gene* 594: 151–159.
- Pires, L.B.; Corrêa Filho, R.A.C.; Sanches, E.A.; Romagosa, E.; Silva, T.G. da; Rech, S.; et

- al. 2018. Colossoma macropomum females can reproduce more than once in the same reproductive period. *Animal Reproduction Science* 196: 138–142.
- Rauco, L.R.R. 2002. Toxicidade aguda do sulfato de cobre e do triclorfon para três espécies de Daphnias em presença e ausência de sedimento. .
- Rebollo, R.; Romanish, M.T.; Mager, D.L. 2012. Transposable Elements: An Abundant and Natural Source of Regulatory Sequences for Host Genes. *Annual Review of Genetics* 46: 21–42.
- Reilly, M.T.; Faulkner, G.J.; Dubnau, J.; Ponomarev, I.; Gage, F.H. 2013. The Role of Transposable Elements in Health and Diseases of the Central Nervous System. *Journal of Neuroscience* 33: 17577–17586.
- Ribeiro, L. 2013. Mapeamento físico cromossômico de elementos repetitivos em Colossoma macropomum (Characiformes, Serrasalminidae) associado à piscicultura.
- Ribeiro, L.B.; Moraes-Neto, A.; Artoni, R.F.; Matoso, D.A.; Feldberg, E. 2017. Chromosomal mapping of repetitive sequences (*Rex3*, *Rex6*, and rDNA genes) in hybrids between *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) and *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Zebrafish*, DOI: 10.1089/zeb.2016.1378.
- Robertson, L.M.; Val, A.L.; Almeida-Val, V.F.; Wood, C.M. 2015. Ionoregulatory Aspects of the Osmorepiratory Compromise during Acute Environmental Hypoxia in 12 Tropical and Temperate Teleosts. *Physiological and Biochemical Zoology* 88: 357–370.
- Rostant, W.G.; Wedell, N.; Hosken, D.J. 2012. *Transposable elements and insecticide resistance*. Vol. 78.1st ed. Elsevier Inc., 169–201p.
- Le Rouzic, A.; Capy, P. 2005. The first steps of transposable elements invasion: Parasitic strategy vs. genetic drift. *Genetics* 169: 1033–1043.
- Sanchez, A.; Yan, L.; Bonafede, M.; Tranquilli, G.; Dubcovsky, J.; Fu, D.; et al. 2006. The wheat and barley vernalization gene VRN3 is an orthologue of FT. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 19581–19586.
- Schrader, L.; Kim, J.W.; Ence, D.; Zimin, A.; Klein, A.; Wyschetzki, K.; et al. 2014. Transposable element islands facilitate adaptation to novel environments in an invasive species. *Nature Communications* 5: 1–10.

- Sene, V.F. De; Daniela, C.P.; Ferreira, C. 2015. Mapping of the Retrotransposable Elements Rex1 and Rex3 in Chromosomes of *Eigenmannia*. : 319–324.
- Sides, C.B.; Enquist, B.J.; Ebersole, J.J.; Smith, M.N.; Henderson, A.N.; Sloat, L.L. 2014. Revisiting darwins hypothesis: Does greater intraspecific variability increase species ecological breadth? *American Journal of Botany* 101: 56–62.
- Silva, F.A. da; Schneider, C.H.; Feldberg, E.; Baccaro, F.B.; Carvalho, N.D.M.; Gross, M.C. 2016. Genomic Organization Under Different Environmental Conditions: *Hoplosternum Littorale* as a Model . *Zebrafish* 13: 197–208.
- Silva, H.C.M. 2016. Mapeamento Cromossômico e Expressão Gênica do Elemento Retrotransponível Rex1 em *Colossoma macropomum* (Serrasalminae, Characiformes) submetidos ao metal pesado Cobre (Cu ++). 1855: 1–65.
- Sinha, A.K.; Vanparys, C.; De Boeck, G.; Kestemont, P.; Wang, N.; Phuong, N.T.; et al. 2010. Expression characteristics of potential biomarker genes in Tra catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*, exposed to trichlorfon. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics* 5: 207–216.
- Thiebaut, F.; Hemerly, A.S.; Ferreira, P.C.G. 2019. A Role for Epigenetic Regulation in the Adaptation and Stress Responses of Non-model Plants. *Frontiers in Plant Science* 10.
- 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. *Cytogenetic and Genome Research* 133: 34–42.
- Veiga, M L ; Rodrigues, E. L. ; Pacheco, F. J. ; Ranzani-Paiva, M. J. T. 2002. Histopathologic changes in the kidney tissue of *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1836 (*Characiformes, Prochilodontidae*) induced by sublethal concentration of Trichlorfon exposure. *Brazilian Archives of Biology and Technology* , Curitiba/PR - Brasil, v. 45, n.2, p. 171-175.
- Veiga, M.M.; Silva, D.M.; Veiga Elabras, B.L.; Faria, M.V. de C. 2006. Pesticide pollution in water systems in a small rural community in Southeast Brazil. *Cad. Saúde Pública* 22: 2391–2399.
- Venturini, F.P.; Moraes, F.D.; Cortella, L.R.X.; Rossi, P.A.; Cruz, C.; Moraes, G. 2014.

- Metabolic effects of trichlorfon (Masoten??) on the neotropical freshwater fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 41: 299–309.
- Volff, J.; Ko, C.; Froschauer, A.; Sweeney, K.; Scharl, M. 2001. Non-LTR Retrotransposons Encoding a Restriction Enzyme-Like Endonuclease in Vertebrates. : 351–360.
- Wagner-Schuman, M.; Richardson, J.; Auinger, P. 2015. Exposition aux pyréthriinoïdes et TDAH : Analyse transversale dans une population d'enfants de 8 à 15 ans. *Environnement, Risques et Sante* 14: 470–471.
- Wicker, T.; Sabot, F.; Hua-van, A.; Bennetzen, J.L.; Capy, P.; Chalhoub, B.; et al. 2007. Our knowledge of the structure and composition of genomes has progressed in pace with their sequencing. As was expected early on. *Nature Reviews* 8: 973–982.
- Wood, C.M.; Gonzalez, R.J.; Ferreira, M.S.; Braz-Mota, S.; Val, A.L. 2018. The physiology of the Tambaqui (*Colossoma macropomum*) at pH 8.0. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 188: 393–408.
- Yoshimura, H.; Endoh, Y.S. 2005. Acute toxicity to freshwater organisms of antiparasitic drugs for veterinary use. *Environmental Toxicology* 20: 60–66.
- Zeh, D.W.; Zeh, J.A.; Ishida, Y. 2009. Transposable elements and an epigenetic basis for punctuated equilibria. *BioEssays* 31: 715–726.